

**ORIGEN, DISTRIBUCIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE *VIBRIOS* PATÓGENOS
HUMANOS EN EL MEDIO AMBIENTE
MARINO DE GALICIA**

Alba M^a Rodríguez Castro

Santiago de Compostela, Septiembre 2012



Universidad de Santiago de Compostela

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

ORIGEN, DISTRIBUCIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE *VIBRIOS* PATÓGENOS
EN HUMANOS EN EL MEDIO AMBIENTE EN
GALICIA

Tesis Doctoral
Alba M^a Rodríguez Castro

Santiago de Compostela, Septiembre 2012



Universidad de Santiago de Compostela

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Jaime Martínez Urtaza, Doctor en Biología y Expert in Food and Waterborne Diseases en el European Center for Disease Prevention and Control (ECDC), como director de esta Tesis Doctoral y Oscar García Martín, Doctor en Biología y Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela, como tutor de la misma,

INFORMAN

Que la presente Tesis Doctoral, titulada “Origen, Distribución y Caracterización de *Vibrios* Patógenos en Humanos en el Medio Ambiente en Galicia”, que presenta Dña Alba M^a Rodríguez Castro para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizada bajo nuestra dirección y supervisión, y considerando que se haya concluida, autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Santiago de Compostela, septiembre, 2012.

Fdo: Dr. Jaime Martínez Urtaza

Fdo: Dr. Oscar García Martín

FINANCIACIÓN

La parte experimental de esta tesis ha recibido financiación del proyecto:

“Investigación ecológica y epidemiológica de *Vibrio parahaemolyticus* en Galicia: Incidencia en el medio marino”, financiado por la Secretaría General de Pesca Marítima del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en el periodo comprendido desde octubre, 2006 a diciembre, 2007.

Asimismo, la doctoranda Dña Alba M^a Rodríguez Castro recibió financiación de este proyecto, mediante una beca predoctoral, para la realización de esta Tesis.

*A mis padres, José Antonio y Lourdes
y a Carlos*

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dedicar las primeras páginas de este trabajo a todas aquellas personas que me han ayudado a realizar esta tesis, y al mismo tiempo agradecerles sinceramente el apoyo que me han brindado. En este periodo de mi vida, he aprendido muchas cosas, pero aún más importante es que he conocido a grandes personas, con las que he compartido muy buenos momentos y que han estado a mi lado todo este tiempo.

A mi director de trabajo de investigación, el Dr. Jaime Martínez Urtaza, debo darle las gracias por haberme permitido trabajar con él y aprender de él, y sobretodo agradecerle la confianza que depositó en mí para llevar a cabo este proyecto. Gracias también por su experiencia profesional que me ha transmitido, por haberme hecho sentir parte de su grupo y por introducirme en el mundo de la Biología Molecular.

Al Dr. Óscar García Martín, debo agradecerle el haberme dado la oportunidad de desarrollar mi trabajo de investigación en el Instituto de Acuicultura y abrirme las puertas de la Unidad de Control de Moluscos (UCM) para que diera mis primeros pasos en la microbiología de *Vibrio parahaemolyticus*.

A Vero, Juan, Silvia e Isa mis compañeros de aventura y confianzas, unos grandes amigos que siempre han estado cuando los he necesitado. Sin ellos este trabajo no sería cada día tan especial y divertido. Gracias por conoceros.

A Sandra, Estela, Naty y Ronnie, agradecerles su amistad y los buenos momentos que hemos pasado en el laboratorio. Gracias también por vuestra ayuda.

A mis amigas de tantos años: Antia, Marta, Piti, Iria, Olalla, Conchi, Isa, María, Andrea, Esther, gracias por estar a mi lado todo este tiempo y sobre todo por el apoyo y el cariño que me habéis dado en esos momentos difíciles.

A Ana Miranda del Centro Oceanográfico de Vigo, agradecerle que mes a mes nos hayan proporcionado las muestras de plancton, agua y mejillón, así como los datos ambientales, imprescindible todo ello para la elaboración de este trabajo.

A María Xosé Rodríguez Álvarez de la Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS), por sus conocimientos y ayuda en Estadística.

A José Varela Pet del Instituto de Investigaciones Tecnológicas de la Universidad de Santiago de Compostela, agradecerle su ayuda y colaboración por la elaboración del mapa GIS que aparece en este trabajo.

A mi familia, tengo que agradecerles que siempre hayan estado cerca de mí animándome y apoyándome.

A mis padres, gracias por vuestro apoyo, cariño y comprensión y por vuestros buenos consejos. A ellos debo en gran parte el haber llegado hasta aquí.

Y por último a Carlos, gracias por estar y aguantarme día a día, compartiendo cada momento y por animarme a no tirar la toalla. Mil gracias vida.

ABREVIATURAS

%	Porcentaje
μl	Microlitro
A/P	Ausencia/Presencia
AMPc	3',5'-Adenosín monofosfato cíclico
AP-PCR	PCR con cebadores arbitrarios
APW	Agua peptonada alcalina
ATP	Adenosín trifosfato
ATTC	Colección Americana de Cultivo Tipo
BPW	Agua peptonada
CC	Complejo clonal
CDC	Centro para el Control y prevención de enfermedades
col	colaboradores
CT	Toxina colérica
ctxAB	Operón que codifica la toxina colérica
CTXØ	Bacteriófago filamentoso que contiene el operón ctxAB
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	didesoxinucleótido
EE.UU.	Estados Unidos
etc	etcétera
Fig	Figura
g	gramos
GIS	Sistema de información geográfica
GS-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa para el grupo específico
h	hora
I _A ^S	Índice de Asociación Estandarizado
kb	kilobyte
kDa	kilodalton
km	kilómetro
KP-	Fenómeno de Kanagawa negativo
KP+	Fenómeno de Kanagawa positivo
kpb	Mil pares de bases
L	litro
LB	medio Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido

m	metro
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
MLEE	Electroforesis de aloenzimas multilocus
MLST	Multilocus sequence typing
mM	Milimolar
NA	Agar nutritivo
NaCl	Cloruro sódico
nm	nanómetro
NMP	Número más probable
°C	Grados Celsius
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en campo pulsante
ppt ó ‰	partes por mil
PT	pulsotipo
rpm	Revoluciones por minuto
s	segundos
ST	Secuencia Tipo
T3SS	Sistema de secreción tipo 3
TCBS	Agar tiosulfato con citrato y sales biliares
TDH	Hemolisina directa termoestable
<i>tdh</i>	Gen de la hemolisina directa termoestable
TM	Toneladas métricas
<i>toxR</i>	Gen especie- específico <i>toxR</i> para <i>V. parahaemolyticus</i>
ToxR	Proteína reguladora codificada por el gen <i>toxR</i>
TPC	Factor de colonización TPC
TRH	Hemolisina relacionada con la TDH
<i>trh</i>	Gen de la hemolisina relacionada con la TRH
TSA	Tryptona soja agar
U	Unidades
UV	ultravioleta
VPI	Isla de patogenicidad del <i>Vibrio</i>
VPIØ	Bacteriófago filamentoso que transfiere la isla de patogenicidad VPI

INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL	5
1.1. Generalidades. Características del género <i>Vibrio</i>	3
1.2. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	8
1.2.1. Diferentes características de la especie <i>V. parahaemolyticus</i> : genéticas, ecológicas, bioquímicas y serológicas.....	8
1.2.2. Infecciones asociadas a <i>V. parahaemolyticus</i>	11
1.2.2.1. Cuadro Clínico	12
1.2.2.2. Susceptibilidad in vitro.....	14
1.2.2.3. Tratamiento	15
1.2.2.4. Prevención	15
1.2.3. Epidemiología de <i>V. parahaemolyticus</i>	16
1.2.4. Epidemiología de <i>V. parahaemolyticus</i> en Europa	20
1.2.5. Características patogénicas y clínicas de <i>V. parahaemolyticus</i>	23
1.2.6. Brotes de <i>V. parahaemolyticus</i> asociados al consumo de mariscos	25
1.2.7. Estacionalidad de los brotes de <i>V. parahaemolyticus</i> asociados a ostra	27
1.3. <i>Vibrio cholerae</i> y el cólera.....	28
1.3.1. Ecología de <i>V. cholerae</i>	30
1.3.2. Virulencia asociada a <i>V. cholerae</i>	32
1.3.3. El cólera: la enfermedad	34
1.3.4. Epidemiología de <i>V. cholerae</i>	36
1.4. Origen y Rutas de dispersión de <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. cholerae</i> : efectos de las aguas de lastre	40
1.5. Impacto sanitario en Galicia asociado a los productos marinos	43
OBJETIVOS	49
CAPÍTULO 1. Prevalencia y diversidad genética de las poblaciones patógenas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en aguas estuáricas de Galicia, España	53
2.1. Resumen	53
2.2. Introducción.....	54
2.3. Material y Métodos	56
2.3.1. Área del estudio.....	56
2.3.2. Recogida de muestras	57
2.3.3. Análisis Microbiológico	58

2.3.4. Análisis por PCR.....	59
2.3.4.1. Extracción del ADN genómico.....	59
2.3.4.2. Detección por PCR	60
2.3.5. Caracterización de las cepas de <i>V. parahaemolyticus</i>	61
2.3.5.1. Electroforesis en gel por campo pulsante (PFGE)	61
2.3.5.2. Serología	61
2.3.6. Parámetros ambientales.....	62
2.3.7. Análisis Espacial	62
2.3.8. Análisis Estadístico.....	63
2.4. Resultados	63
2.4.1. Presencia de <i>V. parahaemolyticus</i>	63
2.4.2. Estacionalidad.....	66
2.4.3. Análisis estadístico	68
2.4.4. Caracterización de las cepas	68
2.5. Discusión	74
 CAPÍTULO 2. Incidencia y dinámica de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en aguas oceánicas de Galicia y su asociación con los factores ambientales	 83
3.1. Resumen	83
3.2. Introducción.....	84
3.3. Material y Métodos.....	86
3.3.1. Diseño del estudio	86
3.3.2. Análisis de <i>V. parahaemolyticus</i>	88
3.3.3. Análisis por PCR y caracterización de cepas.....	89
3.3.4. Análisis estadístico	90
3.4. Resultados	91
3.4.1. <i>V. parahaemolyticus</i> en zooplancton, mejillón y agua.....	91
3.4.2. Influencia de los factores ambientales.....	92
3.4.3. Presencia de genes de virulencia.....	94
3.4.4. Caracterización de cepas aisladas	96
3.4.5. Asociación con el zooplancton	98
3.5. Discusión	100
 CAPÍTULO 3. Dinámica estacional de la presencia de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio cholerae</i> en zonas de producción de cultivo de Galicia	 107
4.1. Resumen	107

4.2. Introducción.....	108
4.3. Material y Métodos.....	112
4.3.1. Área del estudio y colección de muestras.....	112
4.3.2. Análisis microbiológico de <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. cholerae</i>	113
4.3.3. Método de Ausencia-Presencia	114
4.3.4. Método del Número Más Probable (NMP).....	114
4.3.5. Análisis por PCR.....	115
4.3.5.1. Extracción del ADN genómico.....	115
4.3.5.2. Detección por PCR	115
4.3.6. Caracterización de cepas	116
4.3.6.1. Electroforesis en gel por campo pulsante (PFGE)	116
4.3.6.2. Serología	117
4.3.7. Parámetros ambientales.....	117
4.4. Resultados	118
4.4.1. Presencia y Abundancia de <i>V parahaemolyticus</i>	118
4.4.2. Presencia y Abundancia de <i>V cholerae</i>	121
4.4.3. Presencia de genes de virulencia.....	123
4.4.4. Asociación con parámetros ambientales	125
4.5. Discusión	127
 CAPÍTULO 4. Análisis de la Estructura Poblacional de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en Galicia	133
5.1. Resumen	133
5.2. Introducción.....	134
5.3. Material y Métodos.....	139
5.3.1. Aislamientos bacterianos.....	139
5.3.2. Amplificación por PCR y secuenciación	142
5.3.3. Determinación de las secuencias tipos y complejos clonales.....	143
5.3.4. Medida del impacto de la recombinación homóloga usando el Clonalframe... ..	143
5.3.5. Análisis genético poblacional	144
5.4. Resultados	145
5.4.1. Diversidad genética.....	145
5.4.2. Identificación de complejos clonales.....	146
5.4.3. Análisis filogenético de la estructura poblacional de <i>V. parahaemolyticus</i>	150
5.4.4. Recombinación y mutación en diferentes poblaciones de <i>V. parahaemolyticus</i> ..	157
5.5. Discusión	159

CONCLUSIONES	164
BIBLIOGRAFÍA.....	169
ANEXOS.....	199
PUBLICACIONES.....	205

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Asociación de Vibrios patógenos con síndromes clínicos.....	5
Tabla 2. Principales características bioquímicas de algunos miembros de la familia Vibrionaceae.....	7
Tabla 3. Condiciones óptimas de crecimiento de <i>V. parahaemolyticus</i> en agua.....	9
Tabla 4. Características bioquímicas de <i>V. parahaemolyticus</i>	10
Tabla 5. Esquema antigénico para <i>V. parahaemolyticus</i>	11
Tabla 6. Principales brotes de gastroenteritis por <i>V. parahaemolyticus</i> en los EEUU.....	27
Tabla 7. Análisis basado en ostra- infecciones de <i>V. parahaemolyticus</i> informados al Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC).....	28
Tabla 8. Diferenciación de los biotipos “Clásico” y “el Tor” de <i>V. cholerae</i> O1.....	29
Tabla 9. Puntos de muestreo seleccionados en diferentes zonas estuáricas incluyendo los puertos internacionales de Galicia.....	57
Tabla 10. Genes diana y secuencias de oligonucleótidos de primers de <i>V. parahaemolyticus</i> total y patógeno.....	60
Tabla 11. Incidencia de <i>V. parahaemolyticus</i> total y de sus poblaciones patógenas <i>trh+</i> y <i>tdh+</i> en diferentes sitios de muestreo durante todo el período de estudio.....	64
Tabla 12. Incidencia (%) de <i>V. parahaemolyticus</i> total y patógeno observado en diferentes sitios de muestreo, en diferentes profundidades y en diferentes matrices.....	92
Tabla 13. Composición del zooplancton y la abundancia media relativa de los diferentes grupos identificados en todas las muestras recogidas a lo largo del estudio.....	98
Tabla 14. Incidencia y Abundancia media de <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. cholerae</i> en muestras de ostras durante el periodo del estudio.....	118

Tabla 15.	
Dinámica estacional de <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. cholerae</i> en el periodo del estudio	119
Tabla 16 .	
Valores registrados de Temperatura y Salinidad (media, mínima y máxima) en las diferentes estaciones del año.....	125
Tabla 17.	
Información biográfica de las cepas ambientales de <i>V. parahaemolyticus</i> de Galicia utilizadas en este estudio	140
Tabla 18.	
Información biográfica de las cepas clínicas de <i>V. parahaemolyticus</i> procedentes de varios países del mundo	141
Tabla 19.	
Variación de las secuencias nucleótidas para cada locus del MLST	146

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Propagación del clon pandémico de <i>V. parahaemolyticus</i>	18
Figura 2. Principales brotes de <i>V. parahaemolyticus</i> en diferentes regiones del mundo	20
Figura 3. Selección de infecciones reportadas de <i>V. parahaemolyticus</i> en Europa	21
Figura 4. No. de casos de cólera reportados en la OMS por continente y año	38
Figura 5. Ubicación de la región de estudio mostrando las tres áreas de estudio en Galicia (A Coruña, Ferrol y Vigo).....	58
Figura 6. Mapas GIS mostrando la distribución espacial de <i>V. parahaemolyticus</i> total, <i>trh+</i> y <i>tdh+</i> en los puntos de muestreo en las tres áreas de estudio en Galicia	66
Figura 7. Incidencia global de <i>V. parahaemolyticus</i> total, <i>trh+</i> y <i>tdh+</i> en las tres áreas de estudio (A), y en Ferrol (B), A Coruña (C) y Vigo (D), y las variaciones de salinidad y temperatura del agua del mar en todo el período de estudio	67
Figura 8. Dendograma de PFGE circular generado por el software Bionumerics y dibujado usando el paquete de software online iTOL, presenta la relación genética entre las cepas <i>trh+/tdh-</i> , <i>trh-/tdh+</i> y <i>trh+/tdh+</i> en relación a la estacionalidad y al lugar de muestreo	70
Figura 9. Comparación de la relación genética de los patrones de PFGE de las cepas <i>V. parahaemolyticus</i> <i>tdh+</i> obtenidos en este estudio con las cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> <i>tdh+</i> de diferentes partes del mundo	72
Figura 10. Comparación de la relación genética de los patrones de PFGE de las cepas <i>V. parahaemolyticus</i> <i>trh+</i> obtenidos en este estudio con las cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> <i>trh+</i> de diferentes partes del mundo	73
Figura 11. Localización de los puntos de muestreo en la Ría de Vigo de Galicia.....	87
Figura 12. Distribución de <i>V. parahaemolyticus</i> en zooplancton, mejillón y agua de mar durante el periodo del estudio (A) y las variaciones de la salinidad, temperatura (B) y upwelling registradas durante el mismo período (C)	93
Figura 13. Abundancia de las poblaciones de <i>V. parahaemolyticus</i> total, <i>tdh+</i> , <i>trh+</i> en zooplancton (A), mejillón (B) y agua (C).....	95

Figura 14. Dendrograma circular generado por el software Bionumerics y representado con el software iTOL, mostrando las relaciones genéticas entre las 42 cepas <i>trh+/tdh-</i> de <i>V. parahaemolyticus</i> aisladas de zonas oceánicas en el presente estudio y 24 cepas obtenidas de las zonas de estuarios a lo largo de 1500 kilómetros de la costa de Galicia.....	97
Figura 15. Abundancia del zooplankton total, copépodos y el número de especies registradas en el periodo del estudio	99
Figura 16. Ubicación de la zona de muestreo en la Ría de Arousa	113
Figura 17. Incidencia general y abundancia de <i>V. parahaemolyticus</i> en el periodo del estudio (A) y variaciones de temperatura y salinidad en el mismo periodo (B)	120
Figura 18. Incidencia de <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. cholerae</i> en los diferentes puntos de muestreo en la Ría de Arousa	121
Figura 19. Incidencia general y abundancia de <i>V. parahaemolyticus</i> en el periodo del estudio (A) y variaciones de temperatura y salinidad en el mismo periodo (B)	122
Figura 20. Comparación de la relación genética de los patrones de PFGE de las cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> procedente de zonas de cultivo con cepas obtenidas de zonas estuáricas y oceánicas.....	124
Figura 21. Distribución de las diferentes Secuencias tipo (ST) de <i>V. parahaemolyticus</i> obtenidas por el minimum-spanning tree (MST) basadas en un coeficiente categórico y generado por el software Bionumerics (Applied Maths). Cada círculo representa una ST y las agrupaciones de dos o más STs con variantes de uno o dos locus se incluyeron en un complejo clonal (CC). Los colores de los círculos indican las diferentes poblaciones de <i>V. parahaemolyticus</i> , como se muestra en la leyenda de la figura y el tamaño del círculo indica la cantidad del número de cepas incluidas en la ST. El número de loci que difiere entre las STs o CCs está indicado en las líneas de conexión entre ellos.....	148
Figura 22. Distribución de las diferentes Secuencias tipo (ST) de <i>V. parahaemolyticus</i> obtenidas por el Mínimum-Spanning Tree (MST) basadas en un coeficiente categórico y generado por el software Bionumerics (Applied Maths). Cada círculo representa una ST y las agrupaciones de dos o más STs con variantes de uno o dos locus se incluyeron en un complejo clonal (CC). Los colores de los círculos indican los distintos genotipos que presentan las cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> , como se indica en la leyenda de la figura y el tamaño de los círculos muestra la cantidad del número de cepas incluidas en la ST. El número de loci que difiere entre las STs o CCs se muestra en las líneas de conexión entre ellos.....	149
Figura 23. Estudio filogenético obtenido por el Clonalframe a partir de las secuencias concatenadas de los 6 loci obtenidos de MLST de las poblaciones de <i>V. parahaemolyticus</i> tanto estuáricas como oceánicas	152

Figura 24.	
Estudio filogenético obtenido por el Clonalframe a partir de las secuencias concatenadas de las 53 cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> para el estudio poblacional de esta bacteria en Galicia.....	154
Figura 25.	
Estudio filogenético obtenido por el Clonalframe a partir de las secuencias concatenadas de las cepas ambientales de <i>V. parahaemolyticus</i> de Galicia y cepas clínicas procedentes de varias zonas del mundo	156
Figura 26.	
Análisis “Split Tree “de las secuencias concatenadas de los 6 loci escogidos para: A) la población estuárica de <i>V. parahaemolyticus</i> , B) la población oceánica de <i>V. parahaemolyticus</i> y C) la población total de <i>V. parahaemolyticus</i>	158

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Generalidades. Características del género *Vibrio*

El género *Vibrio* pertenece a la familia Vibrionaceae y está constituida por bacilos gran negativos móviles o inmóviles en la que se incluyen los géneros *Vibrio*, *Allomonas*, *Catenococcus*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Listonella*, *Photobacterium* y *Salinivibrio* (Garrity et al., 2004) .

Clasificación taxonómica del género *Vibrio*:

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Vibrionales

Familia: Vibrionaceae

Género: *Vibrio*

Los miembros del género *Vibrio* se definen como bacilos gram negativos, cortos, rectos o curvados, con tendencia al pleomorfismo, pudiendo observarse formas cocobacilares e incluso cocoides. Son anaerobios facultativos y crecen mejor en condiciones alcalinas. El género *Vibrio* está compuesto por microorganismos cuyo hábitat natural son los ecosistemas marinos y fluviales. Son bacterias móviles que presentan un flagelo polar cuando crecen en medios líquidos. Crecen en agar nutritivo incubadas a 35 °C en atmósfera aerobia y anaerobia y fermentan la glucosa. La mayoría producen oxidasa y catalasa, son sensibles al compuesto vibriostático O/129 (2,4 diamino-6,7diisopropilpteridina) y fermentan glucosa sin producción de gas (Baumann et al., 1984; Kaysner C. A. and DePaola, 2001).

El género *Vibrio* contiene más de 48 especies, 12 de ellas patógenas para el ser humano o que han sido aisladas en muestras clínicas y, de éstas, 10 se consideran halófilas. Estas 12 especies patógenas para humanos son: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio carchariae*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio cincinnatiensis*, *Vibrio damsela*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnisii*, *Vibrio (Grimontia) hollisae*, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* (Summer et al., 2001).

También existen varias especies que son patógenas para animales, tanto vertebrados como invertebrados (Dalsgaard et al., 1998; Maugeri et al., 2000). Las especies halófilas requieren para su crecimiento óptimo una concentración de NaCl no inferior al 1%, aunque una concentración de 0,5% permite el aislamiento de las mismas. Una particularidad de algunas especies de este género es su dependencia del ión sodio, incluso de aquellas capaces de crecer en agua de peptona carente de sal. Este catión estimula su crecimiento y favorece la rapidez del mismo. El requerimiento de sodio es específico e independiente de una función osmótica, dado que es difícilmente reemplazable por cantidades equimoleculares de otros cationes monovalentes. El sodio actúa sobre los sistemas de permeasas existentes en la bacteria permitiendo la entrada de sustratos exógenos (Joseph et al., 1982).

Las especies de *Vibrio* son sensibles a pH bajos y su crecimiento es óptimo en pH altos, por lo que las infecciones causadas por éstas son frecuentemente asociadas con alimentos poco ácidos. Las diferentes especies de *Vibrio* requieren concentraciones de pH neutro o ligeramente alcalino (hasta 9), aunque los valores más recomendados en los diferentes medios de cultivo se encuentran entre 8 y 8.8. Además, es necesaria la ingestión de una gran cantidad de células viables de una especie de *Vibrio* patógena para sobrevivir en el ambiente ácido del estómago y provocar una infección. Por medio de la cocción adecuada de los productos alimenticios se inactiva rápidamente a estas especies aún en productos con un gran nivel de contaminación (Comisión del Codex Alimentario, 2010).

Los vibrios son característicamente nativos de hábitats marinos, salobres y estuarinos, y aparecen en grandes concentraciones (blooms) cuando las aguas aumentan de temperatura (17-20°C); a temperaturas bajas los vibrios permanecen en el sedimento de los fondos marinos y los recuentos arrojan normalmente cifras inferiores a las necesarias para producir infección (Joseph et al., 1982). En países templados, los vibrios se encuentran presentes en el agua del mar durante todo el año, aunque su concentración experimenta un notable incremento en los meses cálidos a causa de las favorables condiciones ecológicas y del plancton, aumentando su acumulación por moluscos filtradores y otros animales marinos (Robertson and Tobin, 1983; West, 1989).

El riesgo de intoxicación por vibrios a través de mariscos contaminados es altamente dependiente de la concentración de estas bacterias en agua de mar.

La concentración de especies de *Vibrio* en agua de mar muestra una gran variación estacional, relacionada principalmente con la temperatura del agua y otros factores ambientales. Puede no detectarse (menos de uno por ml) en aguas del océano Atlántico Norte durante el invierno, cuando la temperatura del agua de mar es menor de 6 °C, pero puede alcanzar concentraciones mayores de un millón por ml durante el verano, cuando la temperatura es de 20 °C o superior (Kaneko and Colwell, 1973; Kaspar and Tamplin, 1993; Motes et al., 1998). Muchos de los estudios sobre especies de *Vibrio* han sido realizados en zonas templadas del océano Atlántico con grandes variaciones estacionales de temperatura, o en la costa del golfo de México, donde la temperatura del agua es particularmente alta durante todo el año.

Las especies más destacadas del género *Vibrio* implicadas en un alto número de infecciones alimentarias humanas son *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*. Estas infecciones son provocadas por el consumo de agua, marisco o pescado crudo. La mayor parte de los vibrios se asocian a infecciones del tracto gastrointestinal aunque también se ha descrito su implicación en patología extraintestinal, causando bacteriemia, otitis, conjuntivitis e infecciones de tejidos blandos, entre otras (Tabla 1).

<i>Vibrio</i> spp	Diarrea	Sepsis	Infecciones de Heridas
<i>V. cholerae</i> 01	+++	NO	+
<i>V. cholerae</i> no 01	+++	+	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	+++	+	++
<i>V. vulnificus</i>	++	+++	+++
<i>V. fluvialis</i>	++	+	+
<i>V. alginolyticus</i>	NO	+	+++
<i>V. damsela</i>	NO	NO	++
<i>V. furnissii</i>	+	NO	NO
<i>V. hollisae</i>	++	NO	NO
<i>V. mimicus</i>	++	NO	++
<i>V. metschnikovii</i>	+	+	NO
<i>V. cincinnatiensis</i>	NO	+	NO

Tabla 1: Asociación de Vibrios patógenos con síndromes clínicos. * El símbolo (+) hace referencia a la frecuencia relativa de cada microorganismo en muestras clínicas y (-) indica que no se ha hallado el microorganismo. Adaptado de referencias (Morris and Black, 1985; Morris and Acheson, 2003; Tantillo et al., 2004; Huang and Hsu, 2005).

Las principales especies designadas como agentes etiológicos de gastroenteritis son *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio hollisae* y *Vibrio fluvialis*. La especie *Vibrio vulnificus* es la especie que causa bacteriemia con mayor frecuencia, especialmente en pacientes con enfermedades hepáticas y en inmunodeprimidos. Las infecciones de oído debidas a *Vibrio alginolyticus* ocurren preferentemente en pacientes con perforación en la membrana timpánica o con otitis media crónica (Janda et al., 1988; McLaughlin, 1995).

Los caracteres bioquímicos para establecer una clave de identificación de las especies halófilas y no halófilas del género *Vibrio* son:

- ✓ Reacción de la oxidasa. Positiva en todos los casos, excepto en *Vibrio metschnikovii*.
- ✓ Reducción de nitratos. *Vibrio metschnikovii* es la única especie carente de nitrato-reductasa.
- ✓ Sensibilidad al agente vibriostático O/129. Esta prueba es utilizada para diferenciar distintas especies del género *Vibrio* entre sí y para separar el género *Vibrio* de *Aeromonas*. El NaCl y el MgCl₂ pueden disminuir su acción por lo que se deben utilizar medios con baja concentración de sal.
- ✓ Estudio de las decarboxilasas de Möller. La actividad de la lisina, ornitina decarboxilasa y de la arginina dehidrolasa, permiten separar a las especies halófilas en 4 grupos.
- ✓ Prueba de Voges-Proskauer, producción de gas en la fermentación de la glucosa y el metabolismo de distintos azúcares, entre los que se encuentran sacarosa, lactosa, arabinosa, manitol, inositol, celobiosa y salicina.

En la tabla 2 se resumen las principales características bioquímicas de algunos miembros de la familia Vibrionaceae (Kaysner C. A. and DePaola, 2001).

	<i>Vibrio</i> <i>algynolyticus</i>	<i>Vibrio</i> <i>cholerae</i>	<i>Vibrio</i> <i>fluctalis</i>	<i>Vibrio</i> <i>furmissii</i>	<i>Vibrio</i> <i>holisae</i>	<i>Vibrio</i> <i>metchnikovii</i>	<i>Vibrio</i> <i>mimicus</i>	<i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio</i> <i>vulnificus</i>	<i>Aeromonas</i> <i>hydrophyla**</i>	<i>Plesiomonas</i> <i>shigelloides**</i>
TCBS agar	A	A	A	A	NG	A	V	V	V	A	V
mCPC agar	NC	P	NC	NC	NC	NC	NC	NC	Y	NC	NC
CC agar	NC	P	NC	NC	NC	NC	NC	NC	Y	NC	NC
AGS	KA	KA	KK	KK	KA	KK	KA	KA	KA	KK	NH
Oxidasa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Arginina dihidrolasa	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
Ornitina descarboxilasa	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
Lisina descarboxilasa	+	+	-	-	-	+	+	+	+	Va	+
Crecimiento en :											
0% NaCl	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6% NaCl	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
8% NaCl	+	-	Va	+	-	Va	-	+	-	-	-
10% NaCl	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a 42°C	+	+	Va	-	NH	Va	+	+	+	Va	+
Ácido a partir de :											
Sacarosa	+	+	+	+	-	+	-	-	-	Va	-
D-Celobiosa	-	-	+	-	-	-	-	Va	+	+	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Va	-
Arabinosa	-	-	+	+	+	-	-	+	-	Va	-
D-Manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Va	-
D-Manitol	+	+	+	+	-	+	+	+	Va	+	-
ONPG	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
Voges-Proskauer	+	Va	-	-	-	+	-	-	-	+	-
10 µg O/129	R	S	R	R	NH	S	S	R	S	R	S
150 µg O/129	S	S	S	S	NH	S	S	S	S	R	S
Gelatinasa	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-

Tabla 2. Principales características bioquímicas de algunos miembros de la familia Vibrionaceae . *Adaptado de Elliot et al., 1992). Abbreviations: TCBS: tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa; mCPC: Celobiosa- Polimixina - Colistina modificado; AGS: medio inclinado de arginina-glucosa; A: Amarillo; NC: no crecimiento; S : susceptible; NH = no hecho; V: verde; Va: reacción variable dependiendo de las cepas; R: resistente; P: púrpura; V: variable; KK: Pendiente alcalino / Fondo alcalino; KA : pendiente alcalino / Fondo ácido; Ka = Pendiente alcalino/ Fondo ligeramente ácido.

1.2. *Vibrio parahaemolyticus*

1.2.1. Diferentes características de la especie *Vibrio parahaemolyticus*: genéticas, ecológicas, bioquímicas y serológicas

Vibrio parahaemolyticus es una de las especies más estudiadas del género *Vibrio* debido a su implicación en infecciones alimentarias humanas. La primera intoxicación de *V. parahaemolyticus* fue descrita en el año 1953, por investigadores japoneses encabezados por Fujino en la provincia de Osaka, Japón, debido al consumo de sardinas crudas contaminadas (Fujino, 1966, 1974), registrándose 272 personas afectadas, de las cuales 20 fallecieron. Desde entonces, esta bacteria ha adquirido un rol más protagonista como agente causal de infección gastrointestinal. Se han identificado brotes epidémicos en diversas regiones como Asia, América y Europa (Daniels et al., 2000; Alam et al., 2003; Martinez-Urtaza et al., 2004). Esta especie presenta una gran diversidad y sus miembros pueden diferir en hasta el 60% en la secuencia del DNA de sus genomas (Moreno et al., 2002; Makino et al., 2003). Esta diversidad es bastante clara en los *V. parahaemolyticus* ambientales aislados del agua de mar, de moluscos bivalvos y de peces (Oliver and Kaper, 1997; Gonzalez-Escalona et al., 2005). Sin embargo, en recientes epidemias, esta diversidad es indetectable en aquellos vibrios aislados de las deposiciones de pacientes con infecciones producidas por esta bacteria (Oliver and Kaper, 1997; Daniels et al., 2000a; Daniels et al., 2000b; Gonzalez-Escalona et al., 2005). De esta manera, los vibrios patógenos parecen representar un reducido segmento de esta diversidad y se caracterizan, en general, por tener características fenotípicas y genotípicas bien definidas (Oliver and Kaper, 1997; Daniels et al., 2000a; Daniels et al., 2000b; Gonzalez-Escalona et al., 2005).

V. parahaemolyticus es un miembro halófilo de la familia Vibrionaceae que habita en áreas estuáricas de ambientes marinos templados y tropicales de todo el mundo. Algunas cepas de este organismo causan infecciones entéricas en humanos, las cuales están principalmente asociadas al consumo de moluscos crudos y productos marinos insuficientemente cocinados (DePaola et al., 1990). *V. parahaemolyticus* ha sido regularmente aislado del microbioma de diferentes organismos marinos, como corales (Chimetto et al., 2008), peces (Cabrera-García et al., 2004; Herrera et al., 2006; Miwat et al., 2006; Yang et al., 2008; Terzi et al., 2009), moluscos (Blackstone et al., 2003; FDA, 2005; Martinez-Urtaza et al., 2008b), esponjas (Hoffmann et al., 2010), camarón (Gopal et al., 2005;

Cabanillas-Beltrán et al., 2006) y zooplankton (Kaneko and Colwell, 1973; Baffone et al., 2006). Esta bacteria está distribuida por todo el mundo, pero varía su concentración dependiendo de la estación, de la localización y de la presencia de contaminación fecal (DePaola et al., 2003). Aunque *V. parahaemolyticus* se encuentre de forma permanente en el mar, no implica que exista riesgo permanente de infección, puesto que este riesgo existe sólo con condiciones especiales en el mar, como un aumento de temperatura, especialmente en los meses estivales, favoreciendo su proliferación (DePaola et al., 2003b).

Las condiciones óptimas de crecimiento de *V. parahaemolyticus* en el agua se resumen en la siguiente tabla.

Parámetros de crecimiento	Óptimo	Rango
Temperatura	37 °C	5-43 °C
pH	7.8-8.8	4.8-11
Condiciones atmosféricas	Aeróbica	Aeróbica o anaeróbica
[] NaCl en agua marina	3%	0.5-10%

Tabla 3. Condiciones óptimas de crecimiento de *V. parahaemolyticus* en agua (Paris-Mancilla, 2005). []: Concentración.

Se ha visto que almacenar congelado el alimento, además de detener el crecimiento de *Vibrio*, disminuye su número; no obstante se ha descrito que el *V. parahaemolyticus* congelado sobrevive a -18 °C durante 7 semanas. Esta bacteria muere a temperaturas inferiores a 5 °C y la cocción a temperaturas de 65 °C los inactiva (Doyle, 1990).

V. parahaemolyticus es una especie facultativamente anaerobia, aunque posee dos formas de respiración y su metabolismo es fermentativo. Fermenta la glucosa, sin producción de gas, lactosa, maltosa, manitol, manosa, ribosa y trehalosa. No fermenta la salicina, dulcitol, inositol, celobiosa ni la sacarosa. Este último azúcar forma parte del medio tiosulfato-citrato-bilis sales-sacarosa agar (TCBS; Oxoid) como característica primaria diferencial. *V. parahaemolyticus* es oxidasa, indol, lisina y ornitina decarboxilasa positivo, reduce los nitritos a nitratos y degrada la gelatina, quitina, caseína y lecitina (Alsina and Blanch, 1994).

Las cepas de *V. parahaemolyticus* presentan una alta variabilidad en respuesta a distintas pruebas bioquímicas. Esto dificulta la correcta identificación de la especie basándose únicamente en los aspectos bioquímicos. En la Tabla 4 podemos observar las diferencias en las características bioquímicas de *V. parahaemolyticus* según distintas fuentes consultadas (Kaysner C. A. and DePaola, 2001).

	API 20E	Bergey's	APHA	Alsina <i>et al.</i> , 1993	Tantillo <i>et al.</i> , 2004	Board <i>et al.</i> , 1992
Crecimiento en :						
0 % NaCl		-	-	-	(-)	
3 % NaCl		+	+	+	(+)	
6 % NaCl		+	+	+	(+)	
8 % NaCl		76-89%	+	+	(+)	
10 % NaCl			-	-	(-)	
ONPG	-	-	-	-	(-)	-
ADH	-	-	-	-	(-)	-
LDC	+	+	+	+	(+)	+
ODC	+	+	+	+	(+)	+
CIT	50%	-		+		21-79%
H ₂ S	-	-				-
URE	-	11-25%	(V)	26-74%	(V)	-
IND	+	+		+		+
VP	-	-	-	-	(-)	-
GEL	75%	+	+	+	(+)	+
GLU	+	+		+		+
MAN	+	+	+	75-89%	(+)	+
INO	-	-		-		-
SOR	-	-		-		-
RHA	-	-				-
SAC	-	-	-	-	(-)	-
MEL	-	-		-		-
AMY	12%			-		-
ARA	50%	76-89%	+	75-89%	(+)	21-79%
OX	+	+	+	+	(+)	+

Tabla 4. Características bioquímicas de *V. parahaemolyticus*. Leyenda: (ONPG) β -galactosidasa; (ADH) arginina dihidrolasa; (LDC) lisina decarboxilasa; (ODC) ornitina decarboxylase; (CIT) citrato; (H₂S) producción de H₂S; (URE) ureasa; (TDA) triptofano desaminasa; (IND) producción de indol; (VP) Voges-Proskauer; (GEL) gelatinasa; (GLU) glucosa; (MAN) manitol; (INO) inositol; (SOR) sorbitol; (RHA) ramnosa; (SAC) sacarosa; (MEL) melobiosa; (AMY) amigdalina; (ARA) arabinosa; (OX) citocromo-oxidasa; +, >90% positivos; -, <10% positivos; (+), >80% positivo; (-), <20% positivos; (V), variable.

Serología

La serología es una herramienta epidemiológica valiosa cuando se investiga algún brote de intoxicación por alimentos en el que está implicado algún organismo. Sakazaki y col. (1968) realizaron una clasificación serológica de aislamientos clínicos de *V. parahaemolyticus* empleando un esquema antigénico basado en el antígeno somático O y en el polisacárido capsular K. Hasta el momento se conocen 12 grupos del antígeno O y 70 para el antígeno K. Cinco de estos antígenos K pueden relacionarse con cualquiera de los antígenos del grupo O, por lo tanto hay 76 serotipos reconocidos (Sakazaki et al., 1968).

Grupo O	Grupo K
1	1,25,26,32,38,41,56,58,64,69
2	3,28
3	4,5,6,7,27,30,31,33,37,43,45,48,54,57,58,59,65
4	4,8,9,10,11,12,13,34,42,49,53,55,63,67
5	5,15,17,30,47,60,61,68
6	6,18,46
7	7,19
8	8,20,21,22,39,70
9	9,23,44
10	19,24,52,66,71
11	36,40,50,51,61
12	52
Total	65

Tabla 5. Esquema antigénico para *V. parahaemolyticus* (Kaysner C. A. and DePaola, 2001).

1.2.2. Infecciones asociadas a *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus es un enteropatógeno responsable de brotes de infección en clara asociación con el consumo de pescados y mariscos contaminados, crudos o insuficientemente cocidos. Esta bacteria también se puede transmitir por contaminación cruzada, es decir, por ingestión de cualquier alimento que haya tenido contacto con mariscos o agua contaminados.

Además de la temperatura, existen otros factores como el transporte o almacenamiento de productos del mar con condiciones no adecuadas de refrigeración, que también favorecen la proliferación de la bacteria y, por lo tanto, la posibilidad de infectar. Se considera que la enfermedad puede producirse con una ingesta de 1.000.000 vibriones viables. Es importante destacar que la enfermedad no es transmisible de persona a persona. (Paris-Mancilla, 2005).

1.2.2.1. Cuadro Clínico

El periodo de incubación promedio para la enfermedad causada por *V. parahaemolyticus* es de 15 horas oscilando entre 4 y 96 horas (Paris-Mancilla, 2005).

La infección por *V. parahaemolyticus* causa tres entidades clínicas reconocidas: gastroenteritis, septicemia e infección de heridas. El cuadro intestinal es el más frecuente, caracterizado por diarrea y cólicos abdominales, que pueden acompañarse de náuseas, vómitos, fiebre y cefaleas. Generalmente es autolimitado; la persona se recupera en un periodo de aproximadamente 3 días, que puede variar entre 1 a 7 días, tiempo que no depende del tratamiento con antibióticos. En los casos más severos puede producirse un síndrome disentérico, caracterizado por heces sanguinolentas y fiebre alta (Paris-Mancilla, 2005).

La septicemia primaria es causada por la entrada del microorganismo al torrente sanguíneo a través de la vena porta o del sistema linfático intestinal. Los primeros síntomas incluyen fiebre, hipotensión, compromiso del estado general, escalofríos y ocasionalmente náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal. Su incidencia es baja, pero su severidad y su mortalidad es alta. Los estudios muestran que los individuos sanos tienen bajo riesgo de desarrollar septicemia. Los factores de riesgo importantes incluyen enfermedades crónicas hepáticas, renales, diabetes, neoplasias o aclorhidria (Paris-Mancilla, 2005).

Las infecciones de heridas pueden ocurrir cuando hay lesiones de piel, quemaduras o cortes preexistentes que entran en contacto con el agua de mar o con las especies marinas contaminadas. El cuadro se caracteriza por una lesión en la piel que se desarrolla dentro de las 24 horas posteriores al contacto con el

material contaminado. El sitio de infección se presenta inicialmente con eritema, extremadamente edematoso o equimótico, luego progresa rápidamente a una lesión con vesículas o bulas y finalmente a necrosis que involucra la piel y la grasa subcutánea. Estas infecciones pueden ocurrir tanto en personas sanas como aquellos con enfermedades preexistentes (Paris-Mancilla, 2005).

La virulencia de *Vibrio* ha sido asociada a la producción de dos hemolisinas: la hemolisina termoestable directa (thermostable direct haemolysin -TDH) y la hemolisina relacionada con la TDH (TDH-related haemolysin-TRH). La presencia de los genes que codifican estas hemolisinas es ampliamente utilizada como una característica distintiva en la identificación de aislamientos patógenos. Estos factores de virulencia no son frecuentes en cepas aisladas procedentes de fuentes ambientales y de alimentos. Las cepas que presentan genes *tdh* o *trh* representan menos del 3% de todas las cepas aisladas del ambiente (DePaola et al., 2000).

La hemolisina TDH es el factor de virulencia más importante en el mecanismo de producción de diarrea. Es una proteína de 23 kDa con actividad hemolítica sobre una variada gama de eritrocitos (fenómeno de Kanagawa) y esta actividad no se inactiva calentando a 100 °C durante 10 minutos. Esta proteína muestra enterotoxigenicidad, citotoxicidad, cardiotoxicidad y aumento de la permeabilidad vascular. La toxina TDH es codificada por un gran número de genes *tdh*, que han sido secuenciados, evidenciándose una estrecha relación genética entre ellos (97% de similitud). Para la detección de este marcador de virulencia en aislamientos de *V. parahaemolyticus* se emplean mayoritariamente técnicas moleculares como PCR y sondas de DNA (DePaola et al., 2003b; Panicker et al., 2004).

La hemolisina TRH, también implicada en cuadros de gastroenteritis, es codificada por el gen *trh*, genéticamente relacionado con el *tdh*, con un 69% de homología (Shirai et al., 1990; Iida et al., 1998; Peterson et al., 2002). Esta toxina fue inicialmente localizada en cepas provenientes de casos de gastroenteritis que no presentaban el fenómeno hemolítico de Kanagawa. La hemolisina TRH es una proteína de 23 kDa que no es tan estable al calor como la TDH y tampoco es igual la sensibilidad de los eritrocitos a la lisis por TRH. Al igual que la proteína TDH, la TRH también presenta actividad citotóxica en variedad de tejidos (Okuda et al., 1997; Okuda et al., 1997b; Kaysner C. A. and DePaola, 2001). Se ha estudiado que las cepas de *V. parahaemolyticus* que poseen el gen *trh*

producen ureasa, enzima atípica en otras cepas de *V. parahaemolyticus*, y estos genes pueden formar parte de una isla genómica de patogenicidad (Okuda et al., 1997; DePaola et al., 2003b; Hurley et al., 2006; Parvathi et al., 2006). Además de los anteriores, *V. parahaemolyticus* requiere de otros factores para causar enfermedad, como una variedad de pili, hemagglutininas, factores de colonización y capacidad de invasión celular (Akedo et al., 2002; Peterson et al., 2002).

La mayoría de los aislamientos realizados en pacientes infectados con gastroenteritis muestran reacción Kanagawa positiva (KP+) (Nishibuchi and Kaper, 1995; Cary and Bhatnagar, 2000); sin embargo, la mayoría de las cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas de comidas y ambientes marinos son Kanagawa negativos (KP-). Esto nos indica que las cepas KP- sobreviven mejor en el medio ambiente, mientras que las células KP+ sobreviven mejor en el tracto gastrointestinal (Cary and Bhatnagar, 2000).

Estudios recientes con muestras clínicas y ambientales demuestran un aumento en la prevalencia de los *V. parahaemolyticus* patógenos (Shirai et al., 1990; Parvathi et al., 2006; Julie et al., 2010). Existen observaciones que sugieren que algunos patógenos de *V. parahemolyticus* adquirieron el gen *tdh* y posiblemente el gen *trh*, por transferencia genética horizontal (Yamaichi, 1999). Se ha observado que más del 90% de los aislamientos *tdh* positivos en la costa de los Estados Unidos (EE.UU) son también *trh* positivos (DePaola et al., 2000).

1.2.2.2. Susceptibilidad in vitro

En relación a la susceptibilidad antimicrobiana, no hay estándares de interpretación para *V. parahaemolyticus* (guías NCCLS-CLSI 2005). Usando los estándares de interpretación para *V. cholerae* y Enterobacteriaceae (Peterson et al., 2002; Farmer III J J, 2003), *V. parahaemolyticus* es sensible a tetraciclina, doxiciclina, furazolidona, cotrimoxazol, cloranfenicol, cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos y quinolonas. La resistencia a colistin y ampicilina (esta segunda mediada por β lactamasas), es variable (Heitmann G et al., 2005).

1.2.2.3. Tratamiento

El manejo es fundamentalmente de rehidratación y corrección de los trastornos hidroelectrolíticos y ácido-base (Daniels et al., 2000; Morris and Acheson, 2003). No deben usarse antiespasmódicos ni inhibidores de la motilidad intestinal. No hay estudios con el uso de probióticos en infecciones por este agente. Tampoco se ha demostrado que el uso de antimicrobianos abrevie el curso de la infección; sin embargo, se recomienda su empleo cuando la diarrea excede más de 5 días, en infecciones extraintestinales y en pacientes con co-morbilidad (Daniels et al., 2000; Ho and Amin, 2000; Tantillo et al., 2004).

El fármaco recomendado en estos casos es tetraciclina o doxiciclina a partir de los 9 años de edad o una fluoroquinolona, por un período no menor de 5 días. En pacientes pediátricos pueden usarse cloranfenicol o cotrimoxazol, dependiendo de la susceptibilidad antimicrobiana, o ciprofloxacina en caso de no observarse respuesta al esquema inicial. En infecciones cutáneas o septicemia por este agente, se recomienda tratar agresivamente con antimicrobianos asociados, como cefalosporinas de tercera generación más doxiciclina o aminoglucósidos, o quinolonas más aminoglucósidos, esquema similar al empleado en infecciones causadas por *Vibrio vulnificus* (Tang et al., 2002; Morris and Acheson, 2003). El uso de tetraciclina está avalado en los estudios iniciales por su acción en la síntesis proteica, lo que disminuye la liberación de la toxina TDH.

1.2.2.4. Prevención

Para prevenir la infección, hay que tomar las siguientes medidas (Paris-Mancilla, 2005):

- No comer ningún tipo de marisco crudo o mal cocido, especialmente en los meses más cálidos.
- Hervir los mariscos durante al menos 5 minutos antes de consumirlos.
- Lavar muy bien las manos al cocinar.
- Mantener la cadena de frío de los alimentos.

- Evitar que se produzca contaminación cruzada. Esta contaminación se puede producir en material de trabajo, lavaplatos, etc. y puede afectar a cualquier alimento que tenga contacto con mariscos contaminados o sus residuos (conchas, agua usada en su limpieza u otros).

- Enfriar rápidamente y refrigerar los productos del mar luego de cocidos, si no son consumidos inmediatamente.

- Evitar el contacto de heridas abiertas con aguas o productos posiblemente contaminados.

- Consumir mariscos sólo en lugares públicos autorizados

1.2.3. Epidemiología de *V. parahaemolyticus*

En 1950, investigadores encabezados por Fujino identificaron en Japón una nueva bacteria como el agente causante de un brote asociado al consumo de productos de pescado semi-secos “shirasu”, sardinas crudas (Fujino, 1974). Inicialmente, la nueva especie fue nombrada *Pasteurella parahaemolyticus* (Fujino, 1953) y más tarde fue designado como *V. parahaemolyticus* por el Subcomité de Taxonomía de Vibrios del Organismo Internacional de la Comisión de Bacteriología Sistemática (Hugh and Sakazaki, 1975).

Antes de la década de 1970, casi todas las infecciones notificadas causadas por *V. parahaemolyticus* se limitaban a Japón. Estos brotes de origen alimentario atribuidos a este organismo se asociaron principalmente con pescado, y representaron el 70% de las enfermedades relacionadas con la alimentación durante los meses de verano (Joseph et al., 1982). A principios de la década de 1970, la enfermedades ocasionadas por esta bacteria se encontraron por primera vez en los EE.UU. durante los meses más cálidos en una variedad de lugares incluyendo el Atlántico, el Pacífico y los Estados del Golfo (Barker, 1974). El primer brote bien documentado de *V. parahaemolyticus* en los EE.UU. fue en Maryland en 1971, y fue asociado con el consumo de los productos de cangrejo por contaminación cruzada (Dadisman et al., 1972). Los serotipos de *V. parahaemolyticus* en las cepas aisladas de pacientes y de los alimentos sospechosos en EE.UU. difirieron de los aislados en Japón (Fishbein et al., 1974).

A lo largo de la década de 1970, casos esporádicos y brotes de *V. parahaemolyticus* se registraron en Europa, África, Nueva Zelanda, y en la mayoría de los países asiáticos (Joseph et al., 1982). *V. parahaemolyticus* causa una enfermedad leve que raramente necesita asistencia médica. La mayoría de los casos no son llevados a departamentos de salud pública, por lo que no son publicados. El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de EE.UU. estima que sólo se informa uno de cada veinte casos de *V. parahaemolyticus* (Mead et al., 1999), aunque *V. parahaemolyticus* sea reconocido como la principal causa de gastroenteritis bacterianas asociadas con el consumo de pescados y mariscos en muchas zonas del mundo, incluyendo Japón (Anonymous, 1999), Taiwán (Wong et al., 2000), y EE.UU. (Daniels et al., 2000).

Las infecciones causadas por *V. parahaemolyticus* están generalmente vinculadas con serotipos diferentes y grupos genéticos endémicos, en determinadas zonas costeras de producción de pescados y mariscos (Johnson et al., 2009).

En febrero de 1996 se observó un incremento inesperado en la incidencia de *V. parahaemolyticus* asociados al serotipo O3:K6 entre pacientes hospitalizados en Calcuta, India (Okuda et al., 1997b). Los estudios moleculares han puesto de manifiesto que las cepas de este serotipo asociadas con brotes epidémicos conforman un grupo genético definido, distinto de otras cepas no epidémicas y, también, de cepas O3:K6 aisladas antes de 1996 (Okuda et al., 1997b). La agrupación clonal de las cepas y sus características propias genéticas, han llevado a que este grupo se le denomine "nuevo clon O3:K6" (Okuda et al., 1997b; Chowdhury et al., 2000b). Las enfermedades ocasionadas por el nuevo clon O3:K6 de *V. parahaemolyticus* se extendieron a lo largo de la mayoría de países del sudeste asiático en un periodo de un año (Okuda et al., 1997b). En 1997, el nuevo clon O3:K6 se propagó fuera de Asia, llegando por primera vez a Perú, provocando enfermedades en Junio de ese año (Martinez-Urtaza et al., 2008), y extendiéndose unos meses más tarde a regiones de Chile (Antofagasta) (Gonzalez-Escalona et al., 2005). En 1998, otro gran brote de *V. parahaemolyticus* fue detectado en Estados Unidos, asociado con el consumo de ostras crudas de Galveston Bay, Texas (Daniels et al., 2000b). El tipado molecular indicó que los aislamientos clínicos fueron los mismos que el nuevo clon O3:K6 procedente de Asia (Matsumoto et al., 2000). Esta fue la primera evidencia definitiva de la pandemia de *V. parahaemolyticus*, y fue conocido como "clon pandémico".

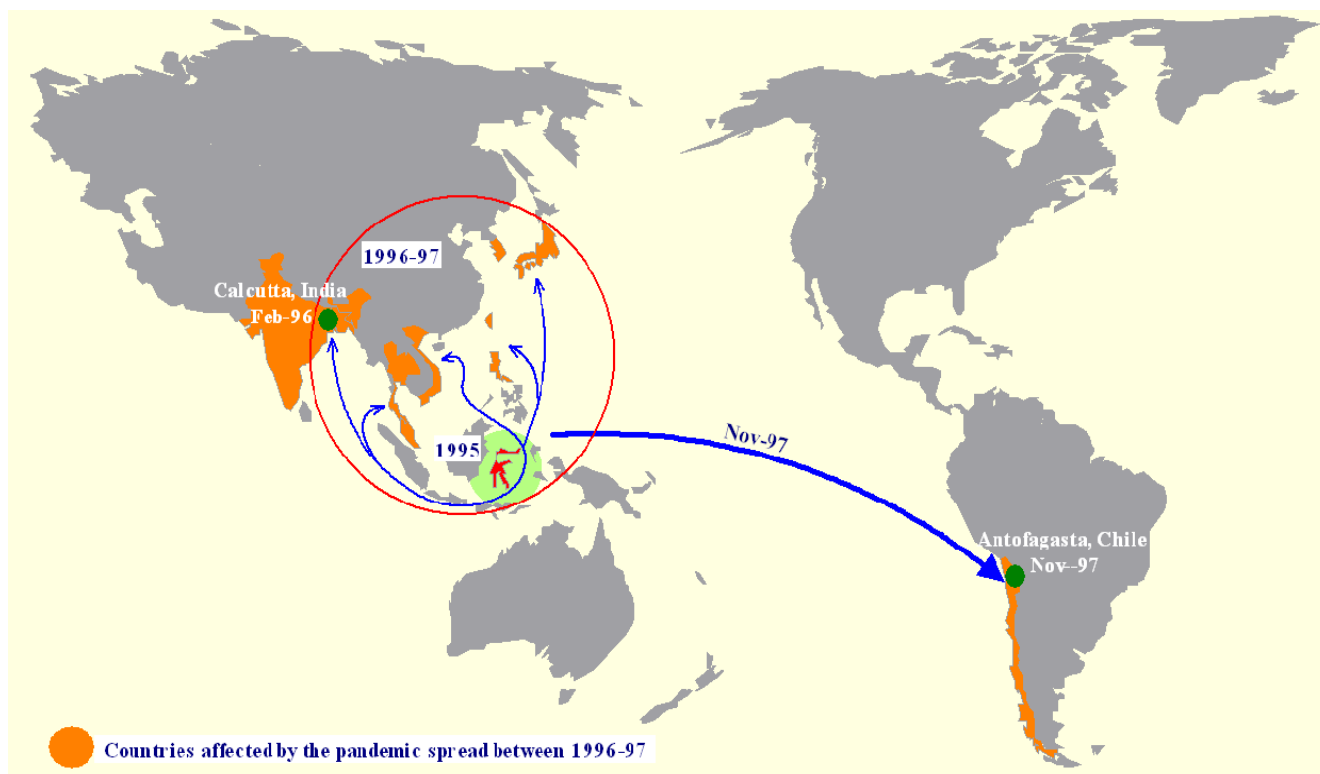


FIG 1. Propagación del clon pandémico *V. parahaemolyticus* (Martinez-Urtaza et al., 2008).

El clon pandémico ha sido detectado en muchos países como Rusia (Nair et al., 2007), Francia (Quilici et al., 2005), España (Martinez-Urtaza et al., 2005), Mozambique (Ansaruzzaman et al., 2005), e Italia (Ottaviani et al., 2008). En pocos años después de su aparición, algunas cepas pertenecientes al nuevo grupo clonal O3:K6 empezaron a seroconvertirse, y se observó que eran genéticamente idénticas por métodos de caracterización molecular (Chowdhury et al., 2000). Una serie de técnicas moleculares que incluye ribotipificación y electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE) ha permitido comprobar que las cepas O3:K6 asociadas con brotes epidémicos en áreas geográficas ampliamente diferentes, conformaban un grupo genético estrechamente relacionado. Un novedoso método de tipificación por PCR, cuyo blanco es una región específica del operón *toxRS*, fue desarrollado para facilitar el diagnóstico rápido de las cepas O3:K6 pandémicas (Matsumoto et al., 2000). Esto condujo al descubrimiento fortuito de otros serotipos como el O4:K68 y O1:KUT (untypable- no tipificable) que tenían el perfil AP-PCR, las secuencias *toxRS*, los ribotipos y los pulsotipos idénticos al del clon pandémico O3:K6 (Matsumoto et

al., 2000; Chowdhury et al., 2000b). Estos nuevos serotipos parecen haber divergido del clon pandémico O3:K6 por alteración de los antígenos O:K y se ha postulado que constituyen derivados clonales del serotipo O3:K6 (Matsumoto et al., 2000; Chowdhury et al., 2000b). Por lo tanto, a este grupo clonal se renombró como "complejo clonal" (Gonzalez-Escalona et al., 2008) y la mayoría de los autores se refieren a él como "complejo clonal pandémico".

Probablemente el cambio más importante en la epidemiología de *V. parahaemolyticus* en los últimos años ha sido la difusión mundial de las infecciones en áreas tales como Chile (Gonzalez-Escalona et al., 2005) y Alaska (McLaughlin et al., 2005), donde este patógeno fue raramente detectado o estuvo ausente. La aparición de brotes de *V. parahaemolyticus* en Chile (Gonzalez-Escalona et al., 2005), Perú (Martinez-Urtaza et al., 2008), Texas (Daniels et al., 2000b), España (Martinez-Urtaza et al., 2005), y Madagascar (Ansaruzzaman et al., 2005) se asocia en gran medida con el complejo clonal pandémico.

Sin embargo, la aparición de brotes epidémicos no es una característica exclusiva relacionadas con cepas pandémicas. La presencia de otros grandes brotes de *V. parahaemolyticus* asociados con cepas de distintos serotipos fueron detectados en diferentes regiones del mundo, como las expansiones epidémicas en la Costa del Pacífico de los Estados Unidos en 1997 (principalmente cepas O4:K12) (Centers for Disease Control and Prevention, 1998), en el Noroeste de España en 1999 (cepas O4:K11) (Martinez-Urtaza et al., 2004), y en Alaska en 2004 (cepas O6:K18) (McLaughlin et al., 2005).

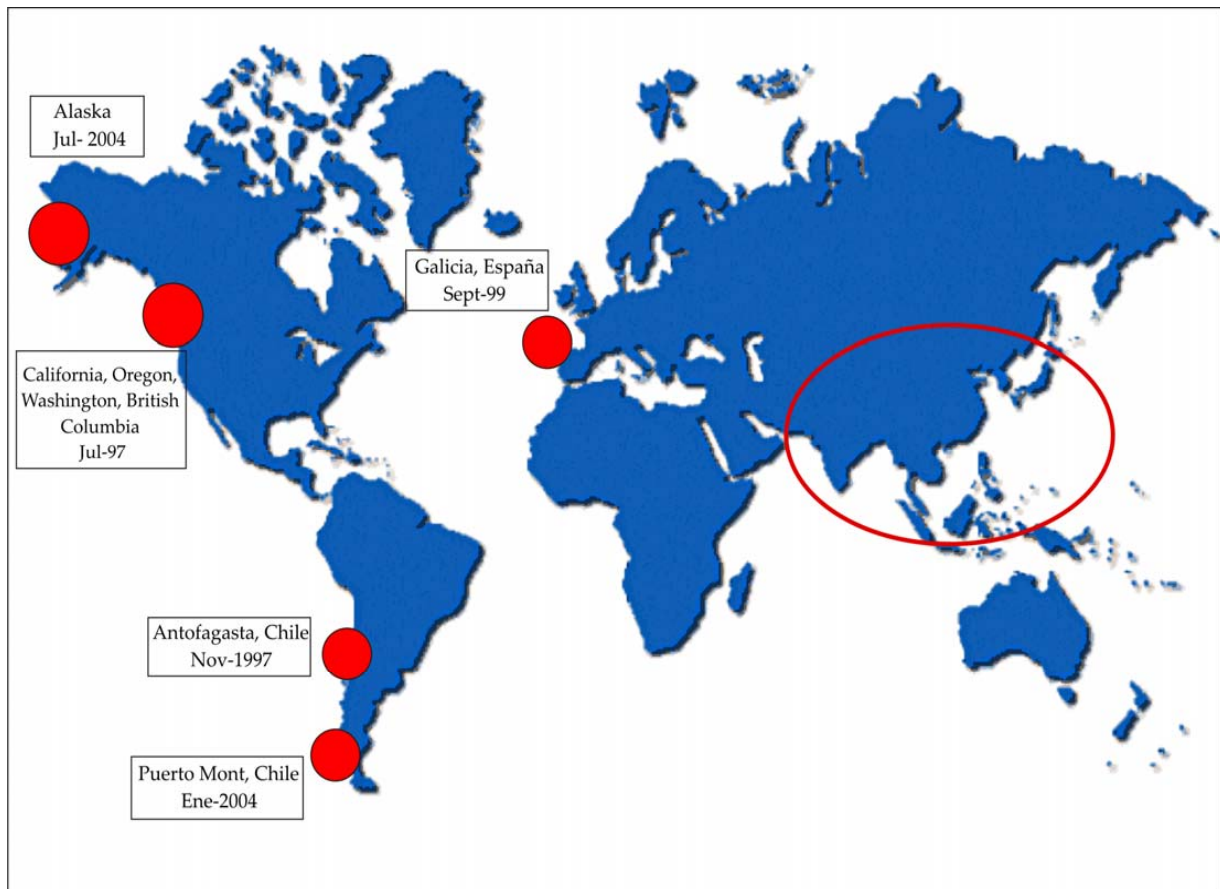


FIG 2. Principales brotes de *V. parahaemolyticus* en diferentes regiones del mundo.

1.2.4. Epidemiología de *Vibrio parahaemolyticus* en Europa

La incidencia de infecciones por *V. parahaemolyticus* en Europa han sido poco conocidas (European Commission, 2001). En el Reino Unido, por ejemplo, sólo se registraron 57 casos de infección por *V. parahaemolyticus* entre 2004-2005, y comprende mayormente infecciones obtenidas por viajar al extranjero a regiones endémicas (Anonymous, 2001; Wagley et al., 2008).

Independientemente, varios brotes esporádicos han sido observados en los últimos 20 años (Fig. 3).

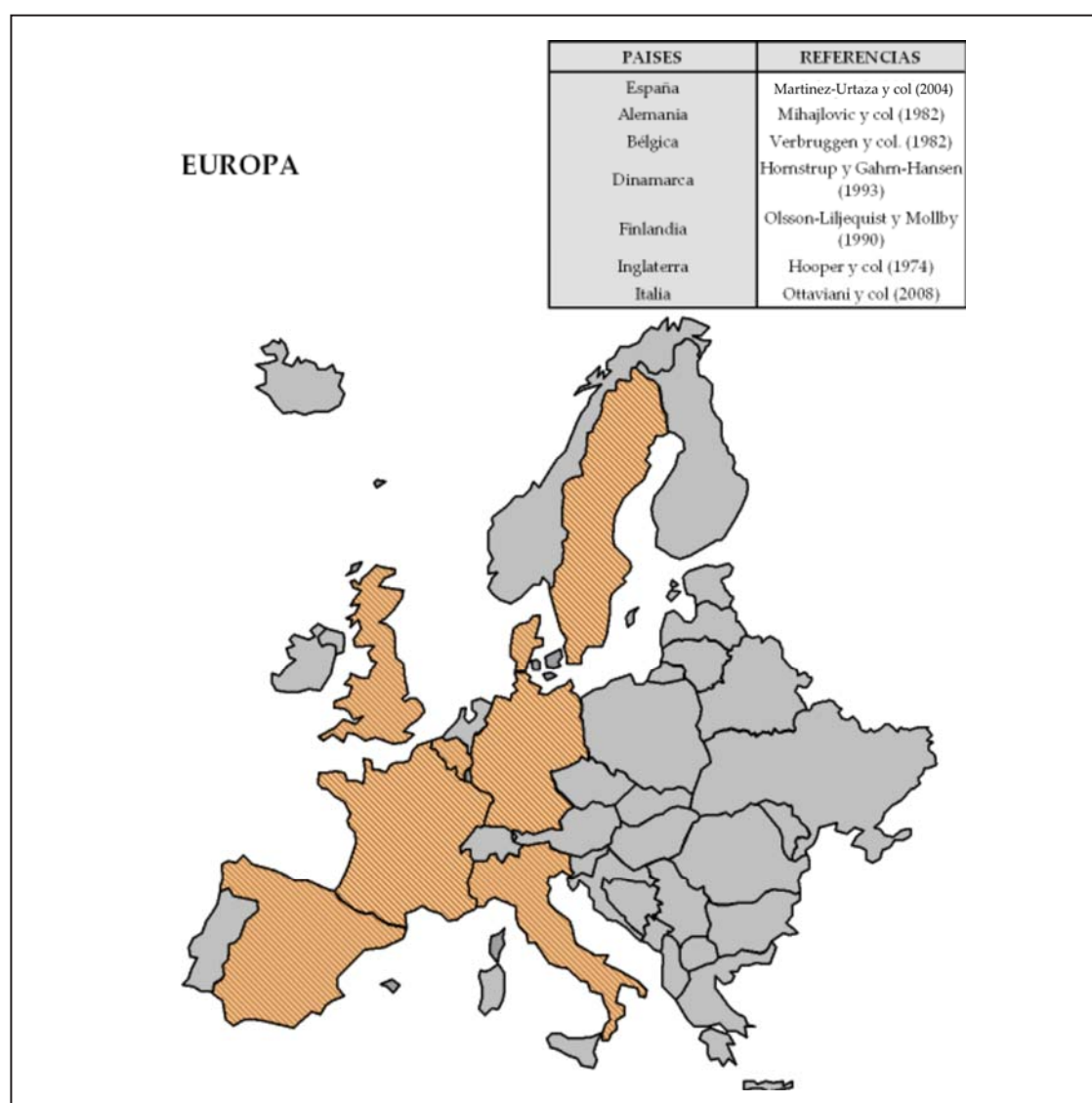


FIG 3. Selección de infecciones reportadas de *V. parahaemolyticus* en Europa (Baker-Austin et al., 2010).

Uno de los primeros brotes de *V. parahaemolyticus* en Europa fue publicado por Peffers y colaboradores en el Reino Unido en 1973, por el consumo de cangrejos (Hooper et al., 1974). En el mismo país en 1974, Barrow notifica otro brote de infección por el consumo de berberechos, en este caso asociado al serotipo O3:K4 (Barrow, 1974). En España, según la literatura existente, diversos autores han informado de casos esporádicos y brotes de infección por *V. parahaemolyticus*. En 1987, Perez y col. presentan un caso de gastroenteritis

aguda y fébril causada por una cepa de *V. parahaemolyticus* después de 20 h de haber ingerido ostras crudas (Perez et al., 1987). Dos años más tarde (1989), Molero y col., informan de un brote de corta duración, donde 8 personas fueron infectadas por el consumo de marisco fresco en diferentes restaurantes de Barcelona (Molero et al., 1989). Todas las cepas caracterizadas fueron Kanagawa positivo y sensibles a diferentes antibióticos. En este mismo año, se describen otros 4 casos de infección tras la ingesta de marisco y pescado. Estas cepas aisladas correspondían al serotipo O4:K8 y fueron Kanagawa positivo (Bartolomé et al., 1989).

La epidemiología de este patógeno cambió abruptamente en 1999, cuando se produjo en Galicia el brote de infección más importante en el continente europeo, afectando a 64 personas que habían consumido ostras vivas en un mercado público de Vigo (Lozano-León et al., 2003). Una situación similar se produjo en Septiembre de 2000, cuando se detectaron 40 casos de *V. parahaemolyticus* en Galicia. En análisis posteriores, utilizando una variedad de métodos moleculares, se demostró que las infecciones fueran asociadas con un clon genéticamente específico del serotipo O4:K11. Este nuevo clon presentaba características distintivas con respecto a los grupos genéticos predominantes en las infecciones clínicas en el mundo, e indicaron una estrecha relación con una cepa clínica del Reino Unido en la década de 1970 (Martinez-Urtaza et al., 2004).

En Julio de 2004, otro importante brote se detectó en A Coruña durante una boda, resultando afectadas 80 personas. El análisis de muestras permitió identificar a *V. parahaemolyticus* como el agente etiológico implicado en el brote. Los estudios por epidemiología molecular revelaron que los aislamientos procedentes de este nuevo brote de infección no pertenecían al clon europeo, sino al clon pandémico asiático del serotipo O3:K6 de este microorganismo (Martinez-Urtaza et al., 2005). Esta fue la primera vez que este clon pandémico se detectó en el continente europeo. Las investigaciones epidemiológicas realizadas durante el brote de A Coruña identificaron al buey de mar, consumido en la boda, como el vehículo más probable de la infección. Este buey había sido cocido en el puerto de A Coruña, probablemente empleando agua de mar de estas instalaciones procedente del propio puerto. Esta agua de mar pudo haber estado contaminada con *V. parahaemolyticus* y posiblemente fuera el origen de la contaminación.

En Italia, se han aislado cepas de *V. parahaemolyticus* asociado al serotipo O3:K6 de un caso clínico que mostraba una infección gastrointestinal (Ottaviani et al., 2008). Numerosos estudios han identificado *V. parahaemolyticus* total como patógeno en muestras de agua y mariscos en diferentes países europeos (Ripabelli et al., 1999; Di Pinto et al., 2008; Wagley et al., 2008).

Otros países europeos como Francia y Noruega, también han investigado la presencia de *V. parahaemolyticus* patógeno, (Hervio-Heath et al., 2002; Robert-Pillot et al., 2004; Ellingsen et al., 2008), obteniendo resultados de un 5% y 2.1% de *V. parahaemolyticus trh+* en 306 y 330 cepas analizadas, respectivamente. Por el contrario, las cepas de *V. parahaemolyticus tdh+* no fueron aisladas en ninguno de estos dos países.

Actualmente, se han logrado algunos progresos en la comprensión de la ecología de las poblaciones patógenas de este microorganismo en el medio ambiente, a pesar de la complicación en los avances en cuanto a la información epidemiológica y la carencia de estudios de *V. parahaemolyticus* desde una perspectiva clínica en Europa. Los estudios llevados a cabo en Galicia (Noroeste de España) han demostrado que las cepas de *V. parahaemolyticus trh+* y *tdh+* son extremadamente raras en las regiones centrales de las rías Baixas asociadas con molusco (Martinez-Urtaza et al., 2008b).

1.2.5. Características patogénicas y clínicas de *Vibrio parahaemolyticus*

La virulencia y las capacidades patogénicas de *V. parahaemolyticus* son menos pronunciadas y graves que las asociadas con otras especies patógenas del género *Vibrio*, como *V. vulnificus*. También se ha observado que las muertes causadas por *V. parahaemolyticus* son menos frecuentes; sin embargo las infecciones provocadas por esta bacteria son muy comunes en todo el mundo (Nordstrom et al., 2007). Las características clínicas de las infecciones ocasionadas por *V. parahaemolyticus* incluyen calambres abdominales, diarreas, náuseas, dolores de cabeza, fiebre y escalofríos (Honda and Iida, 1993). La sintomatología provocada por esta bacteria se produce en menos de 72 h. Se ha reportado un número pequeño de casos de que *V. parahaemolyticus* persiste durante un máximo de 10 días, pero la mayoría de estos casos ocurre en personas inmunodeprimidas. La mayoría de los aislamientos clínicos muestran la actividad beta-hemólisis cuando son cultivadas en agar sangre especializado

(Wagatsuma agar). Las cepas patógenas de *V. parahaemolyticus* producen una variedad de factores de virulencia reconocidos durante la patogénesis. De estos, la hemolisina directa termoestable (TDH) (Nishibuchi et al., 1992; Bej et al., 1999), responsable de la hemólisis de Kanagawa y la hemolisina relacionada con la TDH (TRH) (Honda et al., 1988), son probablemente los principales indicadores de virulencia potencial. Ambos genes comparten varias propiedades biológicas, incluyendo la actividad haemolítica, enterotoxigenidad y citotoxicidad (Park et al., 2004), y han sido considerados marcadores moleculares para distinguir cepas virulentas de las no virulentas (Oliver, 2007).

La presencia de los genes *tdh* y *trh* en la mayoría de las cepas clínicas se ha extendido como marcadores moleculares para analizar cepas potencialmente virulentas. Sin embargo, el análisis del primer genoma completo de *V. parahaemolyticus* en el 2003 (Makino et al., 2003), reveló que los mecanismos patógenos de *V. parahaemolyticus* eran más complejos de lo que se creía. El genoma secuenciado de la cepa RIMD2210633 ha mostrado la existencia de dos tipos de sistema de secreción de tipo III en el cromosoma 1 y en el 2, T3SS1 and T3SS2 respectivamente. Un análisis funcional de estos dos T3SSs reveló que T3SS1 está involucrado en la citotoxicidad, mientras que T3SS2 participa en enterotoxigenidad (Park et al., 2004b). Específicamente, el T3SS2 en el cromosoma 2 está incluido en una gran isla de patogenicidad que consta de 80 kb que está característicamente flanqueada por dos genes *tdh*. Las islas de patogenicidad son grandes regiones del genoma (de 10-100kb), que son adquiridas por transferencia horizontal de genes. Estas islas, frecuentemente poseen elementos genéticos móviles y genes implicados en la virulencia (Dobrindt et al., 2004).

En consecuencia, la presencia del gen *tdh* fue directamente vinculada a la existencia del T3SS. El papel de los T3SSs en la patogenicidad de *V. parahaemolyticus* fue posteriormente estudiado mediante la construcción de cepas mutantes (Park et al., 2004b). Esto determinó el papel específico del T3SS2 en la enterotoxigenidad de *V. parahaemolyticus* y en consecuencia, ha sido identificado como el principal factor implicado en la patogenicidad en humanos. Por otra parte, la secuencia de la región circundante del gen *trh* en el cromosoma 2 de la cepa TH3996 (*V. parahaemolyticus* *trh*+), recientemente ha revelado la presencia de un nuevo T3SS, homólogo al T3SS2 que se encontró en la cepa RIMD2210633, insertado en la isla de patogenicidad (Okada et al., 2009). Okada y col. han demostrado la presencia de una región de DNA de

aproximadamente 100kb, que es considerada como una isla de patogenicidad. Sus resultados también señalaron la presencia de un conjunto de genes del T3SS, que están relacionados con un claro y diferente linaje de los genes T3SS2 en RIMD2210633 (Okada et al., 2009).

Aunque la mayoría de las cepas aisladas de infecciones humanas, tienen al menos uno de los genes hemolíticos, sólo una pequeña proporción ha sido relacionado con cepas de *V. parahaemolyticus* obtenidas en el medio ambiente o alimentos (típicamente < 3%) (DePaola et al., 1990; Nishibuchi and Kaper, 1995; DePaola et al., 2000), las cuales llevan marcadores de genes de virulencia y son potencialmente capaces de causar gastroenteritis en humanos (Oliver, 2007). Mientras que la asociación entre los genes de hemolisina y sus correspondientes T3SS están claramente establecidas entre las cepas clínicas *tdh+* y *trh+* (Meador et al., 2007; Chao et al., 2009; Okada et al., 2009), las investigaciones sobre la presencia de T3SS entre las poblaciones ambientales *tdh+* y *trh+* están todavía en progreso y actualmente hay poca información. La determinación de una vinculación clara entre los genes *tdh* y *trh* positivos y el T3SS en cepas ambientales, sería un apoyo indiscutible para la validación del uso de los genes hemolíticos como marcadores de virulencia universal, proporcionando una valiosa información adicional necesaria para asignar la patogenicidad a las cepas ambientales.

1.2.6. Brotes de *V. parahaemolyticus* asociados al consumo de mariscos

El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) estima que el 62% de los casos de infecciones causados por *V. parahaemolyticus* están asociados con el consumo de ostras crudas (FDA, 2005). El primer caso confirmado de infección causado por *V. parahaemolyticus* y transmitido por alimentos en los Estados Unidos ocurrió en Maryland en 1971 con un brote asociado al consumo de cangrejos cocidos al vapor (Dadisman Jr et al., 1972). Entre 1973 y 1998, cuarenta brotes fueron informados al CDC procedentes de 15 estados y de los territorios de Guam (Daniels et al., 2000). Estos brotes estuvieron asociados con el consumo de mariscos crudos o por contaminación cruzada.

En la Tabla 6 se resumen los principales brotes de gastroenteritis por *V. parahaemolyticus* en los Estados Unidos desde 1997 hasta 2004. En 1997 tuvo lugar un brote con 251 casos en el noroeste del Pacífico (202 en los Estados

Unidos y 49 en la Columbia Británica) (Sample and Swanson, 1997). De estos casos, la infección por *V. parahaemolyticus* fue confirmada en 209 personas que consumieron ostras crudas cultivadas en zonas de California, Oregón y Washington y Canadá (Centers for Disease Control and Prevention, 1998). Los serotipos más comunes de *V. parahaemolyticus* aislados de pacientes implicados en este brote fueron O4: K12 y O1: K56 (Daniels et al., 2000).

Según la bibliografía publicada podemos considerar que en los Estados Unidos, los brotes de *V. parahaemolyticus* asociados a ostras son más comunes que en otros mariscos (Daniels et al., 2000; Agasan, 2002; Potempa, 2004). En 1998, en EE.UU. también se registraron tres importantes brotes independientes. En el Noroeste del Pacífico fueron registrados 48 casos (Therien, 1999). En Texas, un total de 416 infecciones por *V. parahaemolyticus* fueron relacionadas con el consumo de ostra cruda cosechada en la Bahía de Galveston (Daniels et al., 2000), al igual que en Nueva York donde ocurrió el primer brote asociado con molusco crudo, afectando a 23 casos de los cuales 10 se relacionaron también con ostra (Centers for Disease Control and Prevention, 1999).

En el verano de 2002, un grupo de siete casos de infección por *V. parahaemolyticus* parecía estar relacionado con el consumo de mariscos cultivados y adquiridos localmente en Long Island y en el área de Nueva York (Agasan, 2002). En otro brote de ese mismo año, un total de 11 casos con dos muertes se registraron en Nueva Jersey (Mulnick, 2002). Estos casos se atribuyeron a áreas con temperaturas del agua superiores a la media de ese año y como resultado se llevo a cabo el cierre de 110 criaderos de ostra (New Jersey Dept. of Environmental Protection, 2002). Por lo general, la principal causa de gastroenteritis en EE.UU. ha estado asociada al consumo de ostra cruda, recolectada de zonas estuáricas con temperaturas cálidas. Pero se ha observado en otras investigaciones, un importante brote de infección de *V. parahaemolyticus* también relacionado con el consumo de mariscos en Alaska (McLaughlin et al., 2005), donde la temperatura del agua de mar es muy baja y no es óptima para el crecimiento de esta bacteria.

Año	Localización	Nº de casos
1997	Noroeste del Pacífico ^a	209 ^b
1998	Noroeste del Pacífico ^a	48
1998	Texas	416 ^c
1998	Atlántico Nordeste	10 ^b
2002	Nueva York	7
2002	Nueva Jersey	11
2004	Alaska	46 (8 ^b)

Tabla 6. Principales brotes de gastroenteritis por *V. parahaemolyticus* en los EEUU. ^a .El Noroeste Pacífico incluye California, Oregón, Estado de Washington y British Columbia.; ^b. Número de casos que fueron confirmados por cultivo; ^c. Incluye 296 casos en Texas y 120 en otros estados relacionados con cultivos de ostra procedente de Texas.

1.2.7. Estacionalidad de los brotes de *Vibrio parahaemolyticus* asociados a ostra

La mayoría de los brotes de infección transmitidos por los alimentos asociados con *V. parahaemolyticus* en los Estados Unidos ocurren en los meses más cálidos, registrándose un 94% entre Abril y Octubre (Daniels et al., 2000). Datos del CDC (Smith, 2003; FDA, 2005) indican que la relación de ostras con las infecciones causadas por *V. parahaemolyticus* desde 1988 hasta 2001, fueron detectadas en un 60% en el verano y sólo el 4% se produjeron en los meses de invierno. El desglose del número de casos de infección en las diferentes estaciones se presenta en la Tabla 7. Las mismas asociaciones se han observado en otros países. En la India, los aislamientos de *V. parahaemolyticus* también son más predominantes en los meses más cálidos (Okuda et al., 1997) y en Japón los brotes mensuales originados por alimentos relacionados con el *V. parahaemolyticus* son más frecuentes en los meses de verano con un máximo en agosto (International Disease Surveillance Center, 1999).

Estación	2000 ^a	2001 ^a	1988-2001 ^a
Invierno	1	2	22
Primavera	14	17	146
Verano	39	49	354
Otoño	8	7	71
Total	62	75	593

Tabla 7. ^a Análisis basado en ostra- infecciones de *V. parahaemolyticus* informados al Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC)(Smith, 2003).

1.3. *Vibrio cholerae* y el cólera

Vibrio cholerae es el principal organismo causantes de infecciones humanas. Las infecciones causadas por este patógeno tiene una creciente importancia en salud pública debido a que ha sufrido un imparable incremento en su incidencia a nivel mundial durante las últimas décadas. Esta especie es considerada emergente y presentan una distribución mundial (Morris and Black, 1985; Nair et al., 2007).

Este bacilo gram negativo, anaerobio facultativo y móvil, fue descrito por primera vez en 1854 por Pacini en Italia y en 1883 por Robert Koch. Esta bacteria muestra una gran diversidad serológica en función de la composición de su antígeno somático O (Butler and Camilli, 2005). De los cerca de 200 grupos identificados hasta el momento, solamente dos de ellos -O1 y O139-, se reconocen como los únicos responsables de las epidemias del cólera. A su vez, el grupo de cepas del serogrupo O1 se clasifica en dos biotipos: el clásico y el Tor, y en cada uno de ellos se distinguen tres serotipos distintos: Inaba, Ogawa e Hikojima. Probablemente las seis primeras pandemias fueron causadas por cepas del biotipo “el clásico”, aunque en la actualidad, la mayoría de las epidemias de cólera en el mundo son originadas por el biotipo que se conoce como “el Tor”. Entre las cepas clásico y el Tor, existen diferencias en la estructura cromosómica. La comparación de las secuencias de los genes housekeeping (genes de mantenimiento celular) reveló que las cepas de ambos biotipos están muy alejadas entre sí. Las cepas Tor causantes de la pandemia actual están estrechamente relacionadas con cepas ambientales no patógenas. Por lo tanto, esto parece indicar que las cepas pandémicas surgieron de forma

independiente de los diferentes clones ambientales y probablemente adquirieron el serogrupo O1 de manera independiente (Mekalanos et al., 1997).

Test	Resultados del biotipo	
	Clásico	Tor
Hemólisis	-	+
Aglutinación de eritrocitos de pollo	-	+
Voges-Proskauer	-	+
Inhibición de la polimixina B (50-U de disco)	+	-
Lisis por:		
Bacteriófago Classical IV (305)	+	-
Bacteriófago FK (451)	+	-

Tabla 8. Diferenciación de los biotipos “Clásico” y “el Tor” de *V. cholerae* O1 (Kaper et al., 1995).

La diseminación de la enfermedad en India y Bangladesh en 1992, originada por el serotipo O139 o “Bengal”, marcó por primera vez que una cepa de *V. cholerae* no-O1 haya sido asociada a grandes epidemias (Ramamurthy et al., 1993), pero continúa estando confinada al Sur-Este Asiático. *V. cholerae* O139 es responsable de aproximadamente el 15% de los casos de cólera confirmados en los países endémicos de Asia (Swerdlow and Ries, 1993; Berche et al., 1994). El resto de los serogrupos, que se les denomina comúnmente como No-O1 y No-O139, suelen aislarse de fuentes ambientales y pueden producir casos esporádicos de gastroenteritis y de infecciones extraintestinales. De forma ocasional, se pueden encontrar cepas no-O1 y no-O139 que produzcan la toxina cólerica (CT) u otros factores de virulencia, pero sin causar ningún brote epidémico (Kaper et al., 1995). Actualmente, en Florida se ha registrado el primer brote ocasionado por *V. cholerae* O75 por el consumo de ostra cruda. La identificación de este brote podría ser resultado de un incremento en las pruebas de aislamiento de *V. cholerae* en heces humanas. Por otra parte, el brote también pudo ser debido a algún cambio en el medio ambiente, permitiendo que estos patógenos se establecieran o surgieran en las poblaciones de ostras (Onifade et al., 2011).

La virulencia de *Vibrio cholerae* depende de la capacidad para adherirse a la mucosa del intestino delgado, multiplicarse en esta y secretar la enterotoxina. El mecanismo primario por el cual causa enfermedad es la producción de la enterotoxina (CT), que es termolábil y es la principal responsable de las diarreas que se producen.

1.3.1. Ecología de *V. cholerae*

V. cholerae es el único *Vibrio* de transmisión humana (persona-persona) y el hombre ha sido considerado como el principal reservorio de esta bacteria. También presenta un ciclo de vida libre, formando parte de la microbiota de los ecosistemas acuáticos, tanto de aguas saladas como dulces, en las que a menudo se encuentra asociada como comensal a diversos organismos acuáticos (Colwell et al., 1977; Kaper et al., 1979; Colwell et al., 1992). Frecuentemente, se aíslan más cepas no-O1 de origen ambiental que cepas O1, incluso en zonas epidémicas donde podría existir contaminación fecal. Se ha visto que la presencia del microorganismo en el medio acuático no depende únicamente de la magnitud de la contaminación fecal. De hecho, varios estudios han revelado una falta de correlación entre la presencia de bacterias fecales coliformes y la de cepas toxigénicas y no toxigénicas de *V. cholerae* O1 biotipo El Tor en reservorios acuáticos (Colwell et al., 1981; Hood and Ness, 1982), lo que sugiere que el agente patógeno puede sobrevivir en aguas relativamente libres de contaminación fecal humana.

Fuera de las áreas epidémicas (y lejos de las zonas que pueden haber sido contaminadas por pacientes de cólera), los aislamientos O1 son casi siempre CT negativos (Roberts et al., 1982; Motes Jr et al., 1983; Minami et al., 1991). Sin embargo, es evidente que la producción de CT de *V. cholerae* O1 puede persistir en el ambiente en ausencia de la enfermedad humana (Shandera et al., 1983; DePaola et al., 1992). La introducción periódica de los aislamientos ambientales en las poblaciones humanas a través de la ingestión de marisco crudo o mal cocido parece ser responsable de focos aislados de enfermedades endémicas a lo largo de la costa de EE.UU. y de Australia (Blake et al., 1980; Lin et al., 1986; World Health Organization., 1980). También pueden haber sido responsables de las epidemias originadas en Sudamérica.

La persistencia de *V. cholerae* en el ambiente puede ser facilitada por su capacidad de asumir formas de supervivencia incluyendo un estado viable pero no cultivable (VNC) y una forma de supervivencia "rugosa". Se entiende por VNC al estado de «latencia» que permite la supervivencia de ciertas bacterias en condiciones ambientales desfavorables, las cuales permanecen metabólicamente activas, aunque no puedan multiplicarse por los métodos de cultivo habituales (Colwell, 2000; Binsztein et al., 2004). Diversos factores ambientales han sido asociados a la inducción a la forma VNC, especialmente la concentración de nutrientes, temperatura, pH y salinidad, cuando sus rangos no son los adecuados para el estado fisiológico, patógeno y no patógeno de la bacteria (Miller et al., 1984). En condiciones adecuadas, las formas VNC pueden revertir al estado cultivable, manifestando plenamente su capacidad de infección, patogenicidad y transmisibilidad.

Se ha descrito que puede adherirse a la quitina de los caparazones de diferentes crustáceos y puede colonizar la superficie de algas, fitoplancton, copépodos, intestino de peces, raíces de plantas acuáticas (Colwell and Huq, 1994; Faruque et al., 1998) y la superficie de sedimentos de materias orgánicas e inorgánicas en los cuales el *Vibrio* puede encontrar nutrientes para su metabolismo (Borroto, 1998).

Existen distintos aportes que explican la interacción bacteria-reservorio; los primeros trabajos que se conocen sobre esta relación se publicaron en la década de los 70' (Simidu et al., 1971). Se conoce por ejemplo, que *V. cholerae* se asocia con copépodos planctónicos, ya que tienen particular importancia como intermediarios en el ciclo biológico (Colwell et al., 1992). Al respecto, Borroto (Borroto, 1997) menciona que la adhesión del microorganismo a la quitina le otorga mayor resistencia a la acidez del medio y a las bajas temperaturas. Recientemente, Martinelli Filho (Martinelli Filho, 2011), sugiere la existencia de comensalismo, donde el *Vibrio* se favorece por el sustrato quitinoso de donde extrae nutrientes (quitinasa), sin causar efectos delétereos en su huésped. Otros autores proponen la asociación de vibrios en una relación simbiótica con organismos provistos de quitina (Leyton and Riquelme, 2008).

Se ha postulado que los cambios climáticos, como el fenómeno del Niño, son otro factor importante en la aparición de brotes de cólera. Estos cambios marcarían el inicio de una serie de eventos concatenados, como el incremento de la temperatura del agua, de la concentración de nutrientes y de la población de plancton, que se ha asociado con el aumento del número de casos de cólera (Colwell, 1996).

1.3.2. Virulencia asociada a *Vibrio cholerae*

La patogénesis de cólera es un proceso complejo que implica que una serie de factores ayudan al patógeno a colonizar el epitelio del intestino delgado y producir la enterotoxina que interrumpe el transporte de iones en el epitelio intestinal de las células. Aunque la producción de la toxina colérica (CT), codificada por los genes *ctxAB*, es directamente responsable de la manifestación de diarrea, la patogénesis de cólera se basa en la acción sinérgica de otro número de genes, incluidos los genes de uno o más factores de colonización (Kaper et al., 1995). Estos genes codifican para un factor de colonización llamado TCP (toxin co-regulated pilus) y una proteína reguladora ToxR, la cual coregula la CT y la TCP (Herrington et al., 1988). Se encuentran dentro de los elementos genéticos mayores, repartidos en el cromosoma I de la bacteria, que se adhieren horizontalmente mediante la infección de bacteriófagos.

Todas las cepas epidémicas de *V. cholerae* producen la toxina colérica (CT). Esta toxina termolábil está compuesta por cinco copias de la subunidad B unidas a un solo ejemplar de la subunidad A formada por el dímero A1 y A2, todas codificadas por los genes *ctxA* y *ctxB* (Mekalanos et al., 1983). La acción tóxica está unida a la cadena polipeptídica A1, que penetra dentro de la célula y activa la enzima adenilato ciclasa, causando la conversión del adenilato trifosfato (ATP) a adenilato monofosfato cíclico (AMPc). Este aumento de los niveles de AMPc aumenta la pérdida de iones y agua a la luz intestinal.

El operón *ctxAB*, que codifica la toxina colérica, forma parte del genoma de un bacteriófago filamentoso llamado CTXØ, de 6.9 kb que se encuentra lisogenizado en la bacteria (Waldor and Mekalanos, 1996). Este genoma fágico está compuesto por dos dominios funcionalmente descritos, la región central o "core" y la región RS2 (Waldor et al., 1997). En la región central se encuentran, entre otros, los genes de la toxina colérica (*ctxAB*), los genes implicados en la

morfogénesis del bacteriófago (*psh*, *cep*, *orfU* y *ace*) y un gen que codifica una proteína necesaria para el ensamblaje del virión (*zot*). Algunos de estos genes se consideraban que codificaban otras toxinas relacionadas con la patogénesis de cólera, por ejemplo el *zot* (zónula occludens toxin), que aumentaba la permeabilidad de la mucosa intestinal afectando a la estructura de las uniones intercelulares o zónula occludens (Fasano et al., 1991; Baudry et al., 1992) y el *ace* (accessory cholera enterotoxin) que era capaz de inducir la acumulación de líquidos (Trucksis et al., 1993).

La region RS2 incluye los genes necesarios para la replicación (*rstA*), integración (*rstB*) y regulación (*rstR*) de CTXØ (Waldor et al., 1997). Parece que los genes *ctxAB* no participan directamente en la formación de partículas de fago, pero es importante para el fago para proporcionar una ventaja de supervivencia a sus bacterias en el medio ambiente gastrointestinal (Waldor and Mekalanos, 1996).

En relación al TCP, este actúa como receptor del bacteriófago CTXØ y promueve la colonización del epitelio intestinal por parte de la bacteria. Los genes que codifican el factor TCP, están dentro de una isla de patogenicidad VPI (Vibrio Pathogenicity Island), de 40kb, que también es transferida por otro bacteriófago filamentoso denominado VPIØ (Karaolis et al., 1998).

El hábitat natural de las cepas toxigénicas de *V. cholerae*, comprende diferentes ambientes. Uno lo constituye el tracto digestivo del huésped cuando la bacteria se comporta como patógena y el otro es el ambiente acuático cuando actúa como microorganismo de vida libre. La hipótesis actual que se está configurando para comprender la aparición de nuevos clones epidémicos de *V. cholera* sería una serie de sucesos concatenados en el medio acuático y en el intestino humano, en los que participarían el bacteriófago CTXØ y VPIØ, sobre una población de *V. cholerae* capaz de sobrevivir a las defensas inmunitarias del ser humano. Se ha demostrado que a partir de cepas toxigénicas de los serogrupos O1 y O139, se puede inducir la síntesis de nuevas partículas del bacteriófago CTXØ. Este proceso tiene lugar en ambientes naturales acuáticos, aunque los factores ambientales inductores no se han identificado. También en este medio se hace la transducción del bacteriofago VPIØ, que incluye el factor TCP necesario para la posterior infección por parte del bacteriófago CTXØ. Se sabe que los cultivos de *V. cholerae* que contienen fagos en cualquiera de sus formas (lisógenos o plásmidos) producen altos títulos de fagos en el sobrenadante, por lo que la propagación del CTXØ puede estar asociada a

eventos de transferencia horizontal dando lugar a nuevas cepas toxigénicas (Faruque et al., 2000).

Pero la transformación de cepas no patógenas a patógenas sólo puede tener lugar dentro del huésped, el hombre. Para ello debe de ingerirse un número elevado de bacterias que puedan superar la barrera gástrica y al llegar a su hábitat, el intestino delgado, el bacteriófago CTXØ infecta aquellas bacterias en las que reconoce su receptor, el TCP. En este proceso las bacterias adquieren el operón que codifica a la toxina colérica y se transforman en patógenas, iniciando el proceso de colonización, multiplicación y producción de la CT. El ciclo quedaría cerrado cuando las heces de los enfermos y portadores, con un número elevado de bacterias toxigénicas, contaminen ambientes acuáticos naturales (Faruque et al., 1998).

Se han identificado productos génicos implicados tanto en fases patógenas como no patógenas de *V. cholerae*: el PilD es una proteasa necesaria para la secreción de la CT y para el ensamblaje de un apéndice extracelular llamado hemaglutinina manosa sensible (MSHA). Esta hemaglutinina no es un factor de virulencia pero está implicado en la formación de biofilms, característica que se ha observado en ambientes acuáticos, y facilitaría la supervivencia de la bacteria (Watnick and Kolter, 1999)

1.3.3. El cólera: la enfermedad

El cólera es una de las enfermedades infecciosas agudas que se conoce desde hace mucho tiempo, existiendo informes de esta patología desde 1817 (Colwell, 1996). Existen antecedentes escritos que hablan de ella en China, India y la Grecia clásica, citadas por Hipócrates, Galeno y en los escritos sánscritos (Colwell, 1996). Las actuales áreas de endemismos del cólera son India y varios países de África y América Latina (Colwell, 1996; Pan American Health Organization, 2008), aunque también pueden aparecer en forma de epidemias que afecten a uno o a más continentes.

Esta enfermedad se caracteriza por desarrollar bruscamente una intensa diarrea acuosa, habitualmente indolora y con vómitos ocasionales que puede conducir con rapidez a una deshidratación grave y a la muerte si no se trata prontamente. Son heces muy líquidas con presencia de mucosidad pero sin

sangre, adquiriendo un aspecto característico que comúnmente se les denomina “heces de agua de arroz”.

La forma de contagio es por ingestión de agua o por alimentos contaminados con materia fecal, consumidos crudos o insuficientemente cocinados. La carencia o escasez de agua salubre y de las instalaciones adecuadas de saneamiento, así como una deficiente gestión de desechos, contribuyen a la propagación de la enfermedad (World Health Organization, 2010). Uno de los tipos de alimento involucrados son los moluscos bivalvos que se contaminan en el medio marino. Las almejas, ostras, mejillones se suelen consumir crudos o con un tratamiento de calor mínimo, en los cuales, *V. cholerae* puede ser no sólo contaminante de superficie, sino estar presentes en su tracto intestinal, debido a que estas especies son filtradoras y concentran el microorganismo (Costagliola M., 2000).

El periodo de incubación es corto, entre menos de un día y 5 días. La mayoría de los infectados por *V. cholerae* presentan un cuadro leve, pero la bacteria está presente en sus heces durante 7-14 días. Cuando la enfermedad se manifiesta, alrededor del 80%-90% de los episodios tienen carácter leve o moderado y son difíciles de distinguir clínicamente de otras formas de diarrea aguda. Menos del 20% de los enfermos desarrollan el cuadro típico de cólera con signos de deshidratación moderada o grave (puede exceder de 20 litros al día) (Mekalanos et al., 1997), ocasionando la muerte en horas, si no recibe un tratamiento adecuado rápidamente.

Como tratamiento frente al cólera, se necesita una reposición de líquidos y electrolitos. En la mayoría de los casos, se administra una solución de sales de rehidratación oral, pero ante una deshidratación muy acusada, es necesaria la reposición intravenosa de líquidos y solutos perdidos. Solo en los casos graves está indicado el uso de antibióticos como la tetraciclina, doxiciclina, furazolidina.

En cuanto a las medidas de prevención, están se basarían en la desinfección de la red de abastecimiento de agua, la adecuada eliminación de las heces, la mejora en el estado de nutrición de la población, y la correcta manipulación y conservación de alimentos que puedan consumirse en crudo.

En ningún caso se recomienda la vacunación masiva de la población, dada la escasa eficacia de las vacunas clásicas parentales, ya que proporcionan una protección muy corta y se acompaña a menudo de reacciones adversas graves. Actualmente se comercializan dos tipos de vacunas anticoléricas orales que son inocuas y eficaces. Ambas se elaboran a base de bacilos muertos; una de ellas contiene una subunidad B recombinada y la otra no. Ambas brindan una protección superior al 50% que dura dos años en condiciones de endemidad.

La OMS recomienda que en las zonas donde el cólera es endémico, o donde existe el riesgo de que se produzcan brotes epidémicos, la administración de la vacuna anticolérica oral se acompañe de las medidas de control normalmente prescritas. La vacuna surte un efecto por corto tiempo, mientras se llevan a cabo las actividades a más largo plazo como el mejoramiento del abastecimiento de agua y el saneamiento.

La vacunación debe centrarse en los grupos vulnerables que viven en zonas de riesgo elevado y no debe interrumpir la aplicación de otras intervenciones para controlar o prevenir las epidemias de cólera. El instrumento de toma de decisiones en tres pasos de la OMS pretende orientar a las autoridades sanitarias a decidir si deben usar la vacuna anticolérica en situaciones de emergencia complejas (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/es>).

1.3.4. Epidemiología de *V. cholerae*

A lo largo de la historia, poblaciones de todo el mundo se han visto afectadas esporádicamente por brotes devastadores de cólera. Hipócrates (460-377 AC) y Galeno (129-216 DC) ya describieron en su día una enfermedad que probablemente era cólera, y hay muchos indicios de que los habitantes de las llanuras del Río Ganges conocían ya en la antigüedad una enfermedad similar a esta.

Los modernos conocimientos sobre el cólera, sin embargo, datan sólo de los comienzos del siglo XIX, época en que los investigadores como John Snow empezaron a profundizar en las causas de la enfermedad y en su tratamiento.

Se considera que hasta el siglo XIX, las epidemias de cólera se producían en áreas endémicas del sudeste asiático. Pero en 1817, se inicia la primera epidemia de cólera fuera de Asia, y desde entonces se han producido 7 pandemias por

todo el mundo: 1ª pandemia: 1817-1823; 2ª pandemia: 1829-1851; 3ª pandemia: 1852-1859; 4ª pandemia: 1863-1879; 5ª pandemia: 1881-1896; 6ª pandemia: 1899-1923; 7ª pandemia: 1961- actualidad (Blake, 1994).

En 1961 se inició en Indonesia (islas Célebes) la séptima pandémica de cólera, que se propagó rápidamente a otros países de Asia, Europa, África y, finalmente, en 1991, llegó a América Latina, que había estado libre de la enfermedad durante más de un siglo. La enfermedad se propagó rápidamente en esa región, causando casi 400.000 casos notificados y más de 4.000 defunciones en 16 países de América durante ese año.

En 1992 apareció en India y en Bangladesh un nuevo serogrupo –derivado genéticamente del biotipo El Tor- que causó una extensa epidemia. Esta nueva cepa denominada *V. cholerae* O139 “Bengala”, se propagó rápidamente a los países vecinos y desplazó los casos de cólera originados por el serogrupo O1. El cuadro clínico que producía era idéntico al causado por las cepas O1. A partir de estudios moleculares, se ha demostrado que las cepas de *V. cholerae* O139 están muy relacionadas con las cepas O1 el Tor de la séptima pandemia, pero tienen varias características que las distinguen. Las cepas O139 tienen cápsulas, sin embargo no están presentes en las cepas O1. El lipopolisacárido (LPS) del O139 contiene colitosa , azúcar que no está presente en los LPS de las cepas O1, ni tampoco en los LPS de otras especies de la familia Vibrionaceae. Al serogrupo O139 le faltan varios de los genes *rfb*, que son responsables de la síntesis y ensamblaje del antígeno O. Todo ello ha conducido a que algunos autores postulen que este nuevo serogrupo O139 se originó a partir de una cepa O1 el Tor que adquirió DNA extracromosómico, el cual reemplazó los genes *rfb* que codifican para el antígeno O1 (Bik et al., 1995; Popovic et al., 1995).

Después de la aparición de este nuevo serogrupo en 1992, su presencia declinó paulatinamente hasta que en 1994, un nuevo clon O1 el Tor reemplazó el serogrupo O139 en Calcuta. En 1996 reapareció en Calcuta un nuevo clon de *V. cholerae* O139, siendo el serogrupo dominante durante el periodo 1996-1997 (Faruque et al., 2000). Desde 1998 hasta la actualidad, *V. cholerae* O139 sigue confinado en el continente asiático, coexistiendo con cepas no O1, pero todavía no se ha propagado a otros continentes.

En la actualidad, la séptima pandemia sigue su curso y después de 40 años de haberse iniciado no muestra una tendencia al descenso. Presenta diferentes

patrones epidemiológicos según la región que afecta. Mientras en determinados países, generalmente en vías de desarrollo, la enfermedad es endémica, en otros cursa en forma de brotes epidémicos esporádicos. Las tres áreas endémicas más importantes son: África, Asia y América del Sur y Central. En cambio, en los países desarrollados se detectan casos esporádicos, fundamentalmente importados de áreas endémicas o en las que existe un brote epidémico.

En Enero de 1991, las cepas de los brotes de la séptima pandemia se expandieron a lo largo de la costa peruana, registrándose 107.064 casos de *V. cholerae* (OPS, 1991). En 2001, fueron publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), 184.311 casos de cólera y 2.728 muertes relacionadas con esta enfermedad en 58 países (World Health Organization, 2002); el número de casos y muertes es probablemente mucho mayor que este total, debido a un subregistro significativo de cólera en muchos países en los cuales se han producido brotes de cólera y no han sido informados. En contraste con 1990 (Fig 4), cuando los casos fueron concentrados en el continente Americano, se ha observado que a partir de 1996 la mayoría de los casos notificados procedían de África y ocurrían en asociación con epidemias de África meridional y occidental (World Health Organization, 2002).

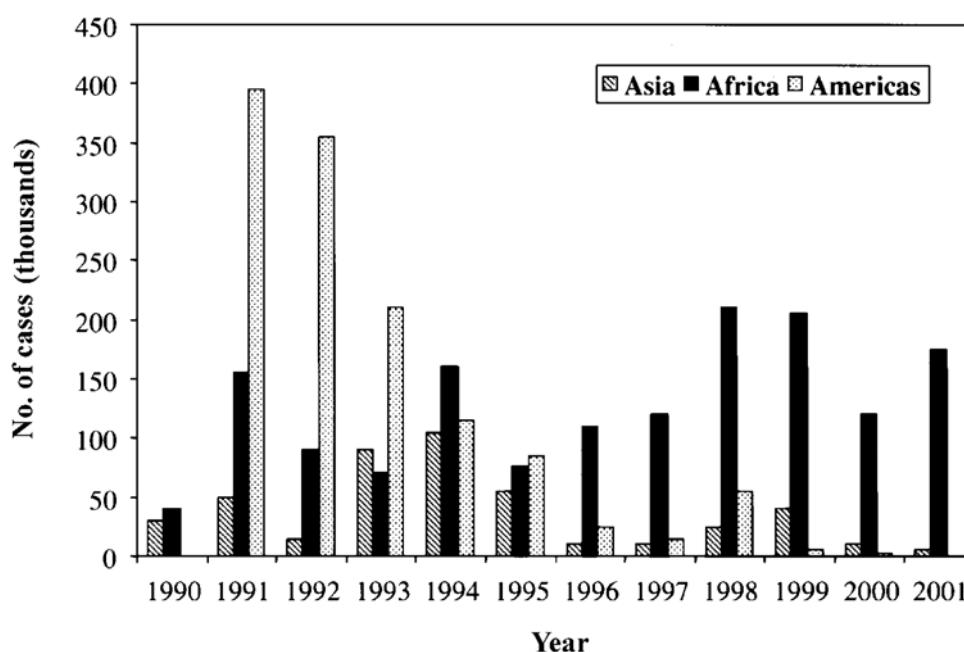


FIG 4. No. de casos de cólera reportados en la OMS por continente y año (World Health Organization, 2002).

Después de un episodio pandémico en una zona geográfica, el cólera generalmente se instala con un patrón endémico de brotes estacionales separados por periodos de inactividad. En América del Sur, por ejemplo, los casos se concentran en los meses de verano (Enero y Febrero). Los estudios llevados a cabo en Perú demuestran que las epidemias estacionales de *V. cholerae* son a menudo anunciadas dos meses antes de que ocurran por un aumento de esta bacteria en el ambiente (provocado, a su vez, por aumentos estacionales de la temperatura del agua) (Franco et al., 1997), con aparentes “desbordamientos” de la bacteria en poblaciones humanas. La aparición y la intensidad de las epidemias también ha sido relacionada con fenómenos climáticos mundiales; la intensidad de la epidemia ha alcanzado su punto máximo en la costa occidental de América del Sur y en Bangladesh, en asociación con el fenómeno de la oscilación austral del Niño (Speelman et al., 2000; Rodó et al., 2002). En Estados Unidos un pequeño foco ambiental epidémico de *V. cholerae* en la Costa del Golfo, parece ser ocupado por un único clon que ha persistido durante 130 años. Los casos de *V. cholerae* causados por esta cepa han sido generalmente unidos al consumo de cangrejos u ostra cruda cultivados en el Golfo de México (Blake et al., 1980; Lowry et al., 1989). Entre 1995 y 2000, se han detectado 6 casos de cólera en los EE.UU. que han estado vinculados con este foco y 8 casos adicionales que se han asociado con mariscos importados (Steinberg et al., 2001).

En los últimos años se han producido brotes masivos en países que llevaban varios años exentos de la enfermedad. En uno de los mayores, que tuvo lugar en Zimbabwe y se prolongó durante 12 meses (de agosto de 2008 a julio de 2009), se registraron 98.591 casos y 4.288 defunciones. El ejemplo más reciente es el brote de cólera que se ha declarado en Haití tras el terremoto que asoló el país a principios de enero de 2010. Los primeros casos fueron diagnosticados a mediados de Octubre, y en Febrero de 2011 el Ministerio de Salud Pública y Población de Haití notificó cerca de 230.000 casos, de los que más de 4.500 habían resultado mortales (World Health Organization, 2010).

Actualmente, en los EE.UU. se notificaron 11 casos de cólera en el estado de la Florida donde se aisló *Vibrio cholerae* O75 toxigénico (Onifade et al., 2011). La causa del brote estuvo asociada al consumo de ostras crudas. Se conoce que cepas de cólera no-O1 circulan a lo largo de las costas del Golfo de México, entre ellas *V. cholerae* O75 y *V. cholerae* O141, ambas toxigénicas. Estos

serogrupos generalmente han causado solo casos esporádicos o pequeños brotes de diarrea severa; sin embargo casos recientemente descritos apuntan a que el *V. cholerae* O75 toxigénico es capaz de causar enfermedad diarreica severa con deshidratación significativa.

1.4. Origen y Rutas de dispersión de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio cholerae*: efectos de las aguas de lastre.

Los orígenes y las vías de difusión de las cepas patógenas de *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* responsables de los grandes brotes son un tema de gran controversia. La propagación de cepas pandémicas de *spp.* procedentes de zonas endémicas se ha atribuido a la descarga de agua de lastre de los buques de carga. Los vertidos de las aguas de lastre se reconocen como un importante vehículo de invasiones biológicas de las especies marinas (Niimi, 2004). Este fenómeno se produce mediante la liberación del agua de lastre de los barcos en zonas próximas a la costa o en puertos y estas prácticas han supuesto la entrada de nuevas especies de animales, plantas, algas y microorganismos en diferentes áreas geográficas, provocando en muchos casos importantes daños ecológicos, económicos y sanitarios.

Se ha estimado que más de 10.000 millones de TM de aguas de lastre se descargan anualmente en el mundo (Niimi, 2004), lo que ha dado lugar a la llegada de numerosas especies exóticas a diversas regiones. Cada buque puede transportar desde varios centenares de litros hasta 100.000 toneladas de agua de lastre, según las dimensiones y finalidades del buque. Se estima que, actualmente, el agua de lastre puede transportar más de 5000 especies de animales y plantas al día en todo el mundo. Así se ha documentado la entrada de mejillón cebra en el este de Norteamérica procedente de Rusia, el cangrejo verde de Europa en California y Australia, el alga *Caulerpa taxifolia* en el Mediterráneo procedente de aguas tropicales, la almeja china en EEUU procedente de China-Corea, o la navaja americana en Europa. También han sido documentados los casos de introducción de especies de dinoflagelados tóxicos causantes de mareas rojas que producen intoxicaciones severas por consumo de moluscos. Este es el caso de la introducción de *Gymnodinium catenatum* en Australia procedente de Japón, *Alexandrium catenella* en Tau Lagoon (Francia) o *Aureococcus anophagefferens* en Norteamérica (Doblin et al.,

2004). Las aguas de lastre también han sido identificadas como vehículos de introducción del clon pandémico de *Vibrio cholerae* O1 serotipo Inaba, biotipo El Tor, en los EE.UU. en 1992 (McCarthy and Khambaty, 1994) y ha sido propuesta como la vía más probable de entrada del clon pandémico asiático de *V. parahaemolyticus* O3:K6 en el Golfo de México que causó importantes brotes de infección en Texas en 1998 (Daniels et al., 2000b) y en A Coruña (España) en 2004 (Martinez-Urtaza et al., 2005). En cada uno de estos episodios, las infecciones surgieron en zonas cercanas a los puertos internacionales y se relacionaron con cepas pandémicas. Estas cepas pertenecientes al complejo clonal pandémico no se detectaron en cualquiera de estas áreas antes de los brotes y ni en casos clínicos o en el medio ambiente después de estos brotes (DePaola et al., 2000). Sin duda, uno de los grandes misterios de la pandemia de *V. parahaemolyticus* es por qué el complejo clonal pandémico llegó a ser endémico en Asia y América Latina, pero no en Europa o América del Norte.

El aumento de los transportes internacionales, el turismo, la construcción de infraestructuras que rompen fronteras naturales o la acuicultura facilitan nuevas vías para que especies procedentes de diversos puntos del planeta colonicen zonas muy alejadas de su hábitat natural. La llegada de una especie extraña a un ecosistema puede convertirse en una amenaza para los organismos nativos al desplazarlos de su hábitat, competir por los mismos recursos o incluso ser sus depredadores. Y no se trata sólo de un problema ecológico. Desde que en 1869 se construyó el Canal de Suez, más de 300 especies procedentes del Mar Rojo se han adentrado en el Mediterráneo. Un caso de migración es el de la medusa *Rhopilema nomadica*, oriunda del Mar Rojo, que en la actualidad cuenta con amplias colonias en el sudeste del Mediterráneo, son tóxicas y afectan de forma grave a la pesca y al turismo.

El tráfico marítimo es otra de las causas por las que las especies logran cruzar océanos, ya que hay algunas que “viajan” adheridas a las quillas de los barcos o en el agua lastre de las embarcaciones cuyo vertido al mar supone la descarga de organismos extraños que pueden deteriorar el medio. “De hecho, un petrolero es un acuario gigante donde bacterias, plancton, larvas e incluso peces pueden sobrevivir durante semanas”, señala Boudouresque (Boudouresque and Verlaque, 2002). Anualmente se transfieren millones de toneladas de aguas de lastre de un lado a otro del planeta, con la consiguiente amenaza de contaminación biológica.

Otra vía adicional de entrada de nuevos clones de agentes patógenos en el medio ambiente marino lo constituye la aportación de residuos generados por cruceros. Se estima que un buque crucero con capacidad para unos 2.000-3.000 pasajeros puede llegar a generar cada día cerca de 1.000 toneladas de residuos (Nowlan and Kwan, 2001) que se dividen de la siguiente manera:

- 550.000-800.000 litros de aguas grises
- 100.000-115.000 litros de aguas negras
- 13.500-26.000 litros de aguas oleosas de sentinas
- 7.000-10.500 kilos de basura y residuos sólidos
- 60-130 kilos de residuos tóxicos.

Todos estos datos obtenidos de los estudios efectuados durante los últimos años parecen indicar que el agua de lastre, el tráfico marítimo y la aportación de residuos de cruceros podrían ser una de las causas que explicaran la entrada de nuevos clones de bacterias patógenas en las costas y que mediante el consumo de productos contaminados, se incorporaran a la cadena alimenticia pudiendo expandirse por una amplia zona geográfica causando infecciones. Este riesgo ha sido ya reconocido por varias organizaciones internacionales. La Organización Marítima Internacional ha señalado que la descarga de agua de lastre puede causar infecciones e incluso muertes debido a la introducción de agentes patógenos y está trabajando para la introducción de regulaciones sobre el tema. Esta organización ha desarrollado y enviado una serie de guías voluntarias para minimizar el efecto del peligro de organismos y patógenos en el control y mantenimiento de las aguas de lastre en los barcos. En estas guías se recomienda tratamientos mecánicos para eliminar organismos procedentes de aguas de lastre. Estos tratamientos deberían de incluir filtración, tratamiento con calor, tratamientos con biocida e irradiación con luz ultravioleta.

La Conferencia de las Naciones Unidas del Ambiente y Desarrollo (UNCED), en Río de Janeiro (1991), reconoció con preocupación la situación e impulsó la necesidad de evaluar medidas apropiadas de reglas en la descarga del agua del lastre, para prevenir la extensión de organismos no autóctonos.

En otras investigaciones realizadas, aun se desconoce cuál puede ser la ruta de diseminación de *V. parahaemolyticus* como es el caso de las infecciones

originadas por esta bacteria en Perú. Ninguna explicación coherente puede ser proporcionada por la llegada de cepas endémicas de Asia hasta la costa del Pacífico de América del Sur. Una investigación retrospectiva de las condiciones oceanográficas durante la aparición del cólera y *V. parahaemolyticus* en Perú reveló que la aparición de estos casos coincide concurrentemente con la llegada de dos episodios de El Niño en el Perú (Martínez-Urtaza et al., 2008). El Niño es un fenómeno complejo de oscilación del sistema océano-atmósfera en la zona ecuatorial del Océano Pacífico, que impacta severamente en el clima de todo el mundo. Este fenómeno también se caracteriza por el movimiento zonal de aguas calientes y menos salinas desde el Pacífico occidental a las costas de América del Sur (Picaut et al., 1996).

Las infecciones causadas por el clon pandémico frente a las costas de Perú en 1997, tuvieron un patrón de dispersión de Norte a Sur coincidiendo con la entrada de masas de agua cálida características del fenómeno de El Niño (Martínez-Urtaza et al., 2008). Este patrón de difusión fue similar al observado durante la aparición de una epidemia de cólera en 1991 (Seas et al., 2000). Los resultados de ambas investigaciones sugieren que el fenómeno de El Niño puede ser un mecanismo para la propagación de cepas de *Vibrio* procedentes de Asia en América del Sur, y abre la posibilidad de que exista un flujo constante de poblaciones de *Vibrio* patógeno a través de las corrientes marinas (Chavez et al., 1999; Ulloa et al., 2001; González et al., 2002). La llegada de zooplancton foráneo, y el colapso de las poblaciones zooplanctónicas nativas coincidieron con estos brotes causados por *Vibrio*. De esta manera, la entrada de copépodos invasores asociados al fenómeno El Niño ha sido sugerido como una fuente potencial de vibrios patógenos y el origen de las epidemias de *Vibrio* en Perú (Martínez-Urtaza et al., 2008).

1.5. Impacto sanitario en Galicia asociado a los productos marinos

Considerando que la actividad económica de Galicia tiene una importante dependencia de su medio ambiente marino, siendo Galicia una de las mayores productoras de moluscos bivalvos del mundo, cualquier problema sanitario asociado con el consumo de moluscos de Galicia va a tener una repercusión directa en su comercialización y en toda la industria asociada a la producción, transformación y comercialización de estos productos. Solamente el mejillón

supone una producción de más de 250.000 TM anuales (datos de 2007) que se extiende por todas sus rías con una cifra de ventas superior a los 180 millones de euros (Anuario-Pesca, 2007). Pero además, gran parte del activo turístico de Galicia está relacionado directamente con su costa donde su población se duplica durante los meses estivales. Por ello, cualquier medida dirigida a minimizar los riesgos para la salud relacionados con el consumo de productos del mar producidos en Galicia, generará una importante mejora de la seguridad alimentaria durante todo el proceso de comercialización de estos productos y que finalmente tendrá una repercusión directa en su imagen comercial a nivel internacional.

Los moluscos bivalvos han sido tradicionalmente catalogados desde el punto de vista alimentario como alimentos de alto riesgo sanitario debido a la capacidad de acumulación de contaminantes biológicos mediante el característico proceso de filtración asociado a su alimentación y respiración. Esta característica biológica se ha visto todavía más remarcada por algunos productos, como por ejemplo las ostras, que suelen consumirse en crudo y vivas, es decir, sin ningún tratamiento culinario que reduzca o elimine la contaminación presente en su organismo y que puede provocar infecciones asociadas a su consumo. Los moluscos bivalvos de interés comercial crecen en las zonas costeras, bien en el bentos marino, o bien en suspensión en dispositivos de cultivo. En ambos casos su hábitat de crecimiento suele estar sometido a una fuerte presión antropogénica, que puede provocar la contaminación por bacterias y virus patógenos humanos, que en el caso de que permanezcan en los moluscos en el momento de su consumo, pueden provocar infecciones de diverso tipo y gravedad dependiendo de cuál sea el agente etiológico implicado.

En el Mediterráneo y en otros lugares, se registra un número cada vez mayor de enfermedades debidas a Norovirus y virus de la hepatitis A. Los casos debidos a *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* son más frecuentes en diferentes partes del mundo, contribuyendo el cambio climático y el calentamiento global a la extensión del rango geográfico en que dichos patógenos están presentes en cantidades significativas.

No es posible gestionar los riesgos asociados con los moluscos bivalvos mediante una estrategia única. Por ejemplo, la prevención de la contaminación fecal es un paso necesario en la gestión de patógenos entéricos, pero esto no reduce los riesgos debidos a especies de *Vibrio*, que son autóctonas de los

ambientes marinos de estuarios y costas. Por este motivo, las zonas de producción de moluscos están sometidas a controles microbiológicos que regulan su extracción, y en el caso de presentar contaminación microbiológica, los moluscos deben ser sometidos a procesos de depuración en agua de mar limpia que reduzcan o eliminen la contaminación hasta niveles que no supongan un peligro para la salud humana, aunque *Vibrio spp.* no esté controlado en estos análisis.

Los sistemas acuáticos de zonas pobladas reciben un constante aporte de agua contaminada por la actividad humana y animal lo que provoca un importante deterioro de este medio. De todas las fuentes de contaminación posibles, la asociada a microorganismos patógenos humanos es la considerada más importante desde el punto de vista sanitario, ya que puede implicar la contaminación del agua de zonas de recreo (playas, piscinas, etc.), agua de consumo público y de zonas destinadas a la acuicultura. La presencia de microorganismos patógenos en estas zonas supone un riesgo para la salud pública, además de una importante pérdida económica debido al cierre de zonas de baño y de las zonas de cultivo de moluscos. El mayor riesgo por contaminación fecal humana es la probable presencia de patógenos entéricos humanos (*Salmonella spp.*, *E. coli* o *Cryptosporidium spp.*). Pero la contaminación fecal puede ser de origen animal que también son reservorios de una variedad de patógenos entéricos. Para establecer los verdaderos riesgos sanitarios asociados a la presencia de microorganismos es necesario conocer la contaminación existente en la zona y conocer su origen. Debido a que es totalmente imposible efectuar análisis de todos los patógenos humanos que puedan ser un riesgo potencial para la salud humana, tradicionalmente se han empleado microorganismos indicadores para predecir la presencia de contaminación fecal en el agua. Un microorganismo indicador ideal sería aquel que no siendo patógeno, pueda detectarse y cuantificarse fácilmente, tenga características de supervivencia similares a las de los patógenos a investigar, y pueda ser estrechamente asociado con la presencia de microorganismos patógenos (Simpson et al., 2002).

El conocimiento general sobre la contaminación microbiológica de las rías gallegas ha progresado notablemente en los últimos años debido a los diversos trabajos publicados recientemente sobre la contaminación de virus, coliformes fecales, *Salmonella spp.*, *V. parahaemolyticus* y *Cryptosporidium spp.* en las zonas de

producción de moluscos y aguas de las rías de Galicia (Romalde et al., 2002; Gomez-Couso et al., 2003; Lozano-León et al., 2003; Martinez-Urtaza et al., 2004). Pero sin embargo es muy limitada la información sobre las vías de entrada de contaminación, los factores que favorecen la aparición de la contaminación, la carga de contaminación diaria recibida y la distribución y permanencia de la contaminación en los ecosistemas acuáticos de las rías. De igual forma, tampoco se han identificado las fuentes reales de contaminación (ríos, poblaciones, plantas de tratamiento de aguas residuales, actividad industrial, etc.) y el peso que cada una de ellas tiene en el aporte diario de carga contaminante. Apenas se tiene información sobre la contaminación de las cuencas fluviales principales que suponen el aporte principal de agua dulce a los sistemas estuáricos. A toda esta ausencia de información hay que añadirle la casi inexistencia de estudios epidemiológicos sobre bacterias entéricas en Galicia y la falta de caracterización de los patógenos aislados, lo que imposibilita la comparación de aislamientos de distintas zonas u orígenes para estudiar su posible relación genética o conexión epidemiológica. Esta información nos permitiría identificar los focos de contaminación y una completa caracterización de la contaminación microbiológica existente en las rías, lo que nos proporcionaría una herramienta muy útil para erradicar los focos de contaminación y con ello mejorar la calidad microbiológica de las aguas costeras y productos marinos, minimizando el riesgo sanitario asociado a ellas y consiguiendo una mejor imagen de nuestras costas y productos alimenticios en los mercados.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El presente trabajo se desarrolló en el Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela dentro de la línea de investigación de bacterias patógenas en el medio marino de Galicia.

El objetivo principal de este trabajo ha sido conocer la prevalencia, dinámica y diversidad genética de las poblaciones patógenas de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio cholerae* en las zonas estuáricas y oceánicas de Galicia en asociación con factores oceanográficos y biológicos que suceden en esta zona.

Objetivos específicos

- Analizar y establecer la distribución y dinámica estacional de las poblaciones de *V. parahaemolyticus* total y patógenas detectadas en zonas estuáricas, incluyendo tanto los puertos internacionales de Galicia como la red de entrada de aguas relacionadas con el transporte marítimo de otras partes del mundo.
- Inferir la relación filogenética y la distribución espacial de los genotipos de *V. parahaemolyticus* para establecer su estructura poblacional en Galicia y mecanismos de aparición de poblaciones patógenas asociadas con nichos específicos.
- Examinar las potenciales relaciones epidemiológicas entre los microorganismos aislados en el medio ambiente de Galicia con aquellos obtenidos de otras fuentes, especialmente procedentes del medio ambiente marino y de brotes de infección detectados en Galicia y otras zonas del mundo.
- Investigar la presencia y abundancia de *V. parahaemolyticus* en áreas oceánicas en el Noroeste de España (Galicia) y determinar las contribuciones de zooplankton con la presencia y la estructura poblacional de *V. parahaemolyticus* en estas zonas.
- Identificar la dinámica estacional de la presencia de *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* en zonas de producción de cultivo de Galicia y su asociación con factores ambientales y oceánicos.
- Determinar la estructura genética de las distintas poblaciones de *V. parahaemolyticus* y su historia evolutiva en los diferentes hábitats tanto en estuáricas como oceánicas en Galicia.

CAPÍTULO 1

-Prevalencia y diversidad genética de las poblaciones patógenas de *Vibrio parahaemolyticus* en aguas estuáricas de Galicia, España-

3. Prevalencia y diversidad genética de las poblaciones patógenas de *Vibrio parahaemolyticus* en aguas estuáricas de Galicia, España

3.1. RESUMEN

Los reservorios naturales y las características biológicas de las poblaciones patógenas de *V. parahaemolyticus* en hábitats marinos aún no se conocen claramente debido a las dificultades que hay en obtener cepas patógenas procedentes en el medio ambiente. La distribución y las características de *V. parahaemolyticus* patógeno han sido investigadas en muestras de agua de mar durante un año en tres áreas estuáricas de Galicia, incluyendo algunas zonas de los principales puertos internacionales de esta región. *V. parahaemolyticus* fue detectado en 35.5% de las muestras analizadas y se aislaron 535 cepas durante el periodo del estudio. En 94 cepas estudiadas, se identificaron genes de virulencia con diferentes perfiles genéticos: 66 *trh+/tdh-*, 24 *trh-/tdh+* and 4 *trh+/tdh+*. Los patrones de distribución espacial y estacional de la población de *V. parahaemolyticus* fueron diferentes en relación a las características genéticas de esta bacteria. Las cepas *trh+/tdh+* fueron exclusivamente detectadas en áreas del norte y en los meses de otoño cuando el agua de mar está más caliente y con menos salinidad, sin embargo las cepas *trh-/tdh+* se encontraron en todas las áreas del estudio durante el invierno y la primavera. La caracterización de cepas potencialmente patógenas procedentes del medio ambiente marino reveló una gran diversidad de serotipos y perfiles de PFGE (pulsotipos) y se observó que no se parecen a las cepas clínicas de *V. parahaemolyticus* que son frecuentes en España. Estos resultados aportan una nueva visión de *V. parahaemolyticus* en Europa, en el que diferentes grupos patógenos son un componente importante de las poblaciones de *V. parahaemolyticus* en hábitats estuáricos.

3.2. INTRODUCCIÓN

Vibrio parahaemolyticus es la principal causa de gastroenteritis bacteriana asociada con el consumo de pescados y mariscos en los Estados Unidos (Mead et al., 1999), y uno de los principales patógenos transmitido por los alimentos en Asia (Joseph et al., 1982). En los últimos años, las infecciones causadas por este organismo han surgido en zonas donde raramente habían sido detectadas, como Chile (Gonzalez-Escalona et al., 2005), Alaska (McLaughlin et al., 2005) y España (Lozano-León et al., 2003; Martínez-Urtaza et al., 2005).

A pesar de la creciente importancia de *V. parahaemolyticus* desde una perspectiva epidemiológica, se consideran pocos los avances que se han evidenciado en el conocimiento de la ecología de las poblaciones patógenas de este microorganismo en el medio ambiente. Casi todas las cepas aisladas de infecciones humanas suelen poseer genes *tdh* o/y *trh*, que son considerados marcadores de virulencia universales (Kaysner C. A. and DePaola, 2001). Sin embargo, las cepas con características de virulencia se encuentran muy pocas veces en el medio marino, incluso en regiones donde se han originado brotes causados por esta bacteria (DePaola et al., 2000). De todos los especímenes patógenos detectados en diversos estudios, sólo entre el 1% y 3 % han sido recuperados de fuentes ambientales (DePaola et al., 1990; Nishibuchi and Kaper, 1995; DePaola et al., 2000). Por lo tanto, la falta de información acerca de la prevalencia y las características de las poblaciones patógenas de *V. parahaemolyticus* en el medio ambiente, limita seriamente nuestra comprensión en cuanto al potencial patogénico y a la dinámica de infección relacionados con este organismo.

En un estudio anterior realizado en Galicia sobre la presencia de *V. parahaemolyticus* en las cuatro principales rías gallegas durante un periodo de tres años, sólo se ha podido describir la presencia de dos cepas *tdh*⁺ procedentes de una muestra de mejillón, después de una caracterización de más de 2.320 cepas (Martínez-Urtaza et al., 2008b). Estos resultados contrastan con la importancia epidemiológica de *V. parahaemolyticus* en Galicia, donde la aparición de tres brotes importantes en esta región, relacionados con diferentes grupos de *V. parahaemolyticus* *tdh*⁺, han sido publicados en años anteriores. Los dos primeros grandes brotes de *V. parahaemolyticus* se detectaron en el sur de Galicia en el año 1999 y 2000 (Lozano-León et al., 2003), y estuvieron asociados con un grupo clonal endémico de serotipo O4:K11 (Martínez-Urtaza et al., 2004). Epidemiológicamente, un tercer brote tuvo lugar en el norte de Galicia en

el año 2004 y fue asociado al puerto de A Coruña. En contraste con los dos brotes anteriores, los casos detectados en A Coruña, se asociaron con cepas pertenecientes al complejo clonal pandémico de *V. parahaemolyticus*, que surgió en Asia en 1996 (Okuda et al., 1997b).

El puerto de A Coruña es un importante puerto marítimo en el noroeste de España con gran tráfico internacional de carga, cruceros y barcos de pesca, y es un punto importante de contacto para el comercio con los países asiáticos. Los datos epidemiológicos obtenidos en esta investigación del 2004 identificaron los vertidos de aguas de lastre de los buques procedentes de este puerto como un plausible origen de *V. parahaemolyticus*. Estas cepas nunca han sido aisladas en Galicia de fuentes ambientales o clínicas, ni antes ni después del brote del 2004, como también se observó en otros brotes asociados con cepas pandémicas, como por ejemplo en Texas en 1998 (Daniels et al., 2000b).

El medio marino de Galicia es un importante centro de actividad económica relacionada con el marisqueo y el turismo. Los puertos de A Coruña, Ferrol y Vigo son los tres principales puertos internacionales en esta región y éstos albergan un intenso tráfico marítimo de Asia y América del Sur, zonas endémicas de principales enfermedades humanas ocasionadas por *Vibrio*. El papel potencial del transporte marítimo existente en estos puertos y en zonas estuáricas adyacentes, puede contribuir en la introducción de nuevas cepas patógenas de *V. parahaemolyticus* en el medio marino de Galicia. Por ello, fue evaluado en este estudio, el impacto de esta actividad sobre el riesgo de aparición de infecciones causadas en el hombre por este agente patógeno marino.

Con las pruebas epidemiológicas anteriores, se ha diseñado este estudio para la detección de posibles cepas patógenas de *V. parahaemolyticus* en las zonas estuáricas vinculados a los brotes en Galicia. Las cepas obtenidas a lo largo del estudio fueron caracterizadas y comparadas con una colección de cepas representativas de diferentes regiones de todo el mundo con el fin de evaluar el carácter endémico de las cepas y la entrada de potenciales bacterias foráneas en el medio marino de Galicia.

3.3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.3.1. Área del estudio

El estudio se llevó a cabo en zonas estuáricas de diferentes áreas (A Coruña, Ferrol y Vigo) incluyendo los tres puertos internacionales de Galicia, localizados en la costa atlántica y occidental de España (Fig 5).

El puerto de Ferrol domina la ría del mismo nombre que baña las costas de los municipios de Ares, Mugardos, Fene, Neda, Narón y Ferrol y a la que se accede entre la Punta Coitelada y el Cabo Prioriño Chico, lugar en el que está situado el Puerto Exterior. Debido a su estratégica posición geográfica, acoge un tráfico continuo de buques mercantes, pesqueros, militares y embarcaciones de recreo. Además de los puntos de muestreo seleccionados en distintas zonas del puerto de Ferrol, también han sido incluidas algunas de estas zonas estuáricas de la ría en este estudio (Tabla 9).

En el área de estudio de A Coruña fueron seleccionados diferentes puntos del puerto de Coruña. El puerto de A Coruña está ubicado en la ría de A Coruña, situada al SW del Arco Ártabro (conjunto formado por las rías de La Coruña, Ares-Betanzos y Ferrol). El puerto de La Coruña es el puerto de mayor volumen mercantil en Galicia y cuenta con más de 6 km de muelles (Muelle de trasatlánticos, Muelle Batería, de Calvo Sotelo, de La Palloza, Muelle Este, del Centenario, de San Diego y de Oza).

En el área de Vigo se incluyeron diferentes zonas de muestreo pertenecientes a esta ría ya que es una bahía con una gran riqueza biológica debido a que en sus aguas afloran las corrientes de aguas profundas y frías procedentes del Norte, portando gran cantidad de nutrientes. Esta ría es la más profunda y meridional de las Rías Bajas de Galicia (España). Está situada al sur de la provincia de Pontevedra, y se extiende en dirección Noreste con una longitud de 35 km desde su bocana en Cabo Silleiro hasta su punto más interior en Arcade, y con una anchura máxima de 7 km que se estrecha en Rande hasta los 700 metros. Conjuntamente, también se incluyeron sitios de muestreos localizados en el puerto de Vigo al ser considerado un puerto de gran importancia debido al tráfico marítimo de transporte de mercancías, pasajeros y pesca.

3.3.2. Recogida de muestras

El programa de muestreo fue diseñado, seleccionando en cada área entre 5 y 6 puntos de muestreo localizados en distintas zonas de la ría donde se desarrolla la actividad portuaria.

Áreas	Puntos de Muestreo	
A Coruña	Punto 1	Muelle del Centenario-Oeste
	Punto 2	Muelle del Centenario-Sur
	Punto 3	Muelle de San Diego
	Punto 4	Tercer pantalán de Repsol
	Punto 5	Muelle pesquero de Oza
	Punto 6	Puerto deportivo de Oza
Ferrol	Punto 1	Puerto interior
	Punto 2	Ensenada de Curruxeiras
	Punto 3	Puerto comercial interior
	Punto 4	Ensenada de Caranza
	Punto 5	Ensenada de Fene
Vigo	Punto 1	Fondeo de Mercantes
	Punto 2	Terminal de Transbordadores
	Punto 3	Terminal de Reparaciones
	Punto 4	Muelle de contenedores de Guixar
	Punto 5	Louxal

Tabla 9. Puntos de muestreo seleccionados en diferentes zonas estuáricas incluyendo los puertos internacionales de Galicia.

Durante un año (de Enero de 2006 a Enero de 2007), se realizaron muestreos de las aguas en los puntos asignados con una frecuencia quincenal. Las muestras fueron inmediatamente transportadas al Instituto de Acuicultura para su procesamiento y fueron sometidas a investigación de patógenos empleando técnicas convencionales y de biología molecular.

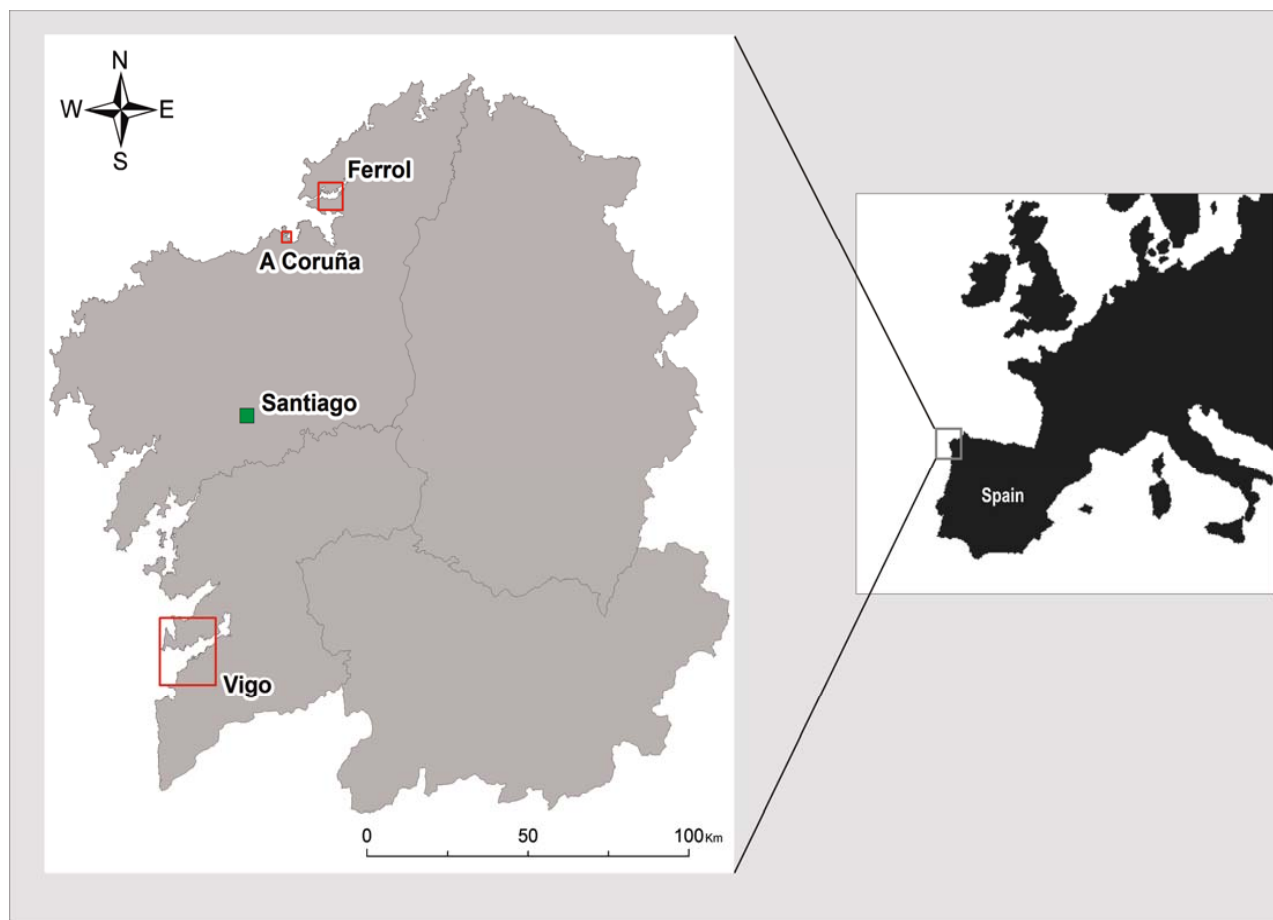


FIG. 5. Ubicación de la región de estudio mostrando las tres áreas de estudio en Galicia (A Coruña, Ferrol y Vigo).

3.3.3. Análisis microbiológico

Las muestras de agua de mar se analizaron por filtración empleando una bomba de vacío. Para ello, de cada muestra de agua de mar se filtraron entre 100 ml y 150 ml utilizando filtros de nitrato de celulosa estériles de 0'45 μm (Sartorius). Cada filtro fue analizado por el método de ausencia-presencia de *V. parahaemolyticus* añadiéndolo 225 ml de caldo de cultivo APW (agua peptonada alcalina) (ver anexo, medio 1) a 37 °C durante 18-24 horas. Tras su incubación, se sembraron en medios TCBS (tiosulfato – citrato – sales biliares – sacarosa, Merck) (ver anexo, medio 2) y ChromAgar (ChromAgar, Paris, France) (ver anexo, medio 3). Las colonias sospechosas de *V. parahaemolyticus* en las placas de TCBS y ChromAgar se aislaron en TSA (ver anexo, medio 4) al 2% de ClNa para las diferentes pruebas bioquímicas y su posterior confirmación por API 20E (bioMérieux) y PCR.

En los diferentes métodos de análisis se emplearon cepas control que proceden de la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC) y aislamientos de origen clínico. A todas las muestras se le han realizado los análisis de ausencia-presencia (A/P) según la norma ISO8914 (ISO 8914, 1990).

3.3.4. Análisis por PCR

3.3.4.1. Extracción del DNA genómico

Las alícuotas del caldo de enriquecimiento de APW fueron utilizados para la extracción de DNA. Un mililitro (ml) de caldo fue centrifugado a 1.000 rpm durante 2 minutos. El sobrenadante fue trasladado a un nuevo tubo y centrifugado nuevamente a 10.000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y el consiguiente pellet fue resuspendido en 300 microlitros (μ l) de 1xTE buffer (10 mM Tris pH8, 0,1 mM EDTA) (ver anexo, medio 5) y centrifugado nuevamente a 12.000 rpm durante 7 min. Después de que el sobrenadante fuera desechado, el sedimento fue resuspendido con 300 μ l de 5% Chelex (Biorad, Hercules, California) (ver anexo, medio 6) y calentado a 56 °C durante 20 minutos. Con el fin de lisar las células, la suspensión fue hervida a 100 °C durante 10 min y se puso de inmediato en hielo durante 2 min. El lisado se centrifugó a 13.000 rpm a 4 °C durante 5 minutos, y el sobrenadante obtenido que contenía DNA fue transferido a un tubo nuevo y almacenado a -20 °C hasta su uso en los análisis por PCR.

Para la extracción de DNA de los aislamientos, una cantidad de cultivo puro fue trasladado a 5 ml de caldo Luria-Bertani con 2% de NaCl (ver anexo, medio 7), incubándose por la noche a 37 °C en un baño con agitación. Un ml de caldo de cultivo fue transferido a un tubo de 1,5 ml y centrifugado a 10.000 rpm durante 7 min. El pellet resultante fue resuspendido en 300 μ l de 1 xTE buffer y las suspensiones celulares fueron lisadas por ebullición durante 10 min. El lisado fue centrifugado a 13000 rpm a 4 °C durante 5 minutos y el sobrenadante fue transferido a otro tubo y almacenado a -20 °C hasta su uso.

La cuantificación de DNA se realizó diluyendo 1:10 el DNA en agua libre de nucleasa (SIGMA) y su absorbancia fue medida a 260 nm en un espectrofotómetro Bio-Photometer (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

3.3.4.2. Detección por PCR

La presencia de *V. parahaemolyticus* en caldo y la confirmación de los presuntos aislamientos fue investigada utilizando el gen específico Vp-toxR de *V. parahaemolyticus*, según el protocolo PCR descrito por Kim y col. (Kim et al., 1999) (Tabla 10). La presencia de genes relacionados con virulencia *tdh* y *trh* en caldo y en aislamientos se determinaron por PCR independientes para cada gen, de acuerdo con Tada y col. (Tada et al., 1992) (Tabla 8). Para la detección de especímenes pertenecientes al clon pandémico de *V. parahaemolyticus* se empleó la prueba del grupo específico GS-PCR descrito anteriormente por Matsumoto (Matsumoto et al., 2000).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador PTC 200 (MJ Research, South San Francisco, California). Todos los productos de PCR fueron comprobados por electroforesis en geles de agarosa 1,6 % (tipo II de agarosa, Sigma-Aldrich, USA) (ver anexo, medio 8) teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml; Sigma) (ver anexo, medio 9) y fotografiados en un transluminador Alpha innotech 2200 UV y procesados en el Alphaimager 2200 (Alpha innotech, San Leandro, California). Las cepas sin amplificación de Vp-toxR por PCR fueron consideradas negativas y no fueron sometidas a un análisis de los genes de virulencia de *V. parahaemolyticus*.

Las cepas de referencia AQ4037 (*trh*+, *tdh*-), ATCC43996 (*tdh*+, *trh*-) y VP81 (cepa pandémica, *trh*-/*tdh*+) se utilizaron como controles en todas las pruebas bioquímicas y ensayos de PCR.

Primer	Secuencias	Bp (pares de bases)	Tamaño amplicón (bp)
<i>toxR</i> (Forward)	5'- GTCTTCTGACGCAATCGTTG - 3'	20	368
<i>toxR</i> (Reverse)	5'- ATACGACTGGTTGCTGTCATG -3'	21	
<i>tdh</i> (Forward)	5'- CCACTACCACTCTCATATGC - 3'	20	251
<i>tdh</i> (Reverse)	5'- GGTACTAAATGGCTGACATC -3'	20	
<i>trh</i> (Forward)	5'- GGCTCAAAATGGTTAAGCG - 3'	19	250
<i>trh</i> (Reverse)	5'- CATTTCCGCTCTCATATGC -3'	19	

Tabla 10. Genes diana y secuencias de oligonucleótidos de los primers de *V. parahaemolyticus* total y patógeno.

3.3.5. Caracterización de las cepas de *V. parahaemolyticus*

3.3.5.1. Técnica de Electroforesis en gel por Campo pulsante (Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE))

Esta técnica ha sido aplicada en estudios epidemiológicos para la tipificación de bacterias y se basa en una electroforesis en geles de agarosa, que permite separar fragmentos de DNA de hasta 2.000 kb. El equipo se fundamenta en la propiedad que tienen los fragmentos grandes de DNA de fraccionarse en geles de agarosa si son sometidos a dos campos eléctricos alternados no homogéneos de orientación perpendicular. Esta técnica fue realizada según la técnica normalizada “One-Day (24-28h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of Non-typhoidal *Salmonella* by PFGE” (Centers for Disease Control and Prevention, 2002), adaptada a *V. parahaemolyticus* mediante el empleo de enzimas de restricción diferenciadas y condiciones de electroforesis propias (Martinez-Urtaza et al., 2004). El DNA cromosómico fue digerido con 30 U (unidades) de NotI (Promega, Southampton, United Kingdom), a 37 °C durante 4 h. Los fragmentos de restricción de DNA fueron resueltos en geles de agarosa SeaKem Gold Agarose (Cambrex, Baltimore, MD) (ver anexo, medio 10) en 0.5X de buffer TBE (ver anexo, medio 11). También se utilizó DNA de *Salmonella Braenderup* H9812 como marcador de tamaño, y fue digerido con 50 U de XbaI (promega, Madison, WI) a 37 °C durante dos horas. Los tiempos de pulso fueron de 2 a 40 s durante 18 horas a 6,0 V/cm. Los patrones de restricción se compararon con el software BioNumerics (Matemática Aplicada, Sint-Martens-Latem, Bélgica) y los resultados se mostraron en un árbol circular obtenido por el software online iTOL (Letunic and Bork, 2007).

3.3.5.2. Serología

El sistema de serotipificación de *V. parahaemolyticus* incluye 13 antígenos somáticos “O” y 71 capsulares “K” diferentes. La determinación de serotipos por combinación O:K ha resultado útil para la caracterización de cepas detectadas en brotes de infección. El lipopolisacárido (OR) y el capsular (K) de los aislamientos positivos se determinaron por pruebas de aglutinación con antiseros específicos, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Denka-Seiken Ltd., Tokio (Japón)).

3.3.6. Parámetros ambientales

Los parámetros ambientales incluidos en el estudio fueron: temperatura del aire, el viento, las horas de sol, lluvia, temperatura del agua del mar y la salinidad.

La temperatura ambiente diaria fue considerada como la temperatura media registrada en un día. La dirección del viento fue medida como el tiempo en horas que el viento soplabla en cada uno de los cuatro cuadrantes (noroeste, noreste, suroeste y sureste), o como ausencia de viento (calma). La velocidad del viento se midió en km por día y las precipitaciones como mm de precipitación diaria. En cuanto a los parámetros oceánicos (temperatura del agua del mar y la salinidad) para cada sitio de muestreo, se obtuvieron a partir de los datos proporcionados por el programa vigilancia del medio marino de Galicia, llevado a cabo por el Instituto Tecnológico para el Control del Medio Marino de Galicia (INTECMAR, Xunta de Galicia, Vilagarcía de Arousa, España), a excepción de los datos de salinidad del puerto de A Coruña que no fueron registrados.

Los datos de la temperatura ambiente, el viento, las horas de sol y la lluvia fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Meteorología del Ministerio de Medio Ambiente y se registraron en las estaciones meteorológicas: 1354 situada en la ría de Ferrol (coordenadas: 8 ° 15' 37"W; 43° 28' 31"N, altura 4 m), 1387 situada en la ría de A Coruña (coordenadas: 8° 22' 42" W; 43° 18' 15" N; altitud 97 m), y 1495 situada en la ría de Vigo (coordenadas: 8 ° 37' 5 'W; 42° 13 ' 25 "N, altitud 255 m).

También se ha incluido el transporte marítimo de buques procedentes de otros continentes en este periodo del estudio. Esta información ha sido facilitada por la autoridad portuaria de los tres puertos internacionales de Galicia (A Coruña, Ferrol y Vigo).

3.3.7. Análisis espacial

Los resultados de los análisis fueron evaluados por el software ArcGis versión 9,1 del Sistema de Información Geográfica (GIS) y la extensión Spatial Analyst fue calculada por ESRI (Environmental Systems Research Institute). Los datos fueron analizados por una distancia inversa ponderada (IDW) algoritmo de

interpolación con los siguientes ajustes: poder 2 (distancia euclidiana), 12 puntos y variable radio búsqueda. Los formatos de datos fueron Shapefile (vector data) y GRID (raster data) por ESRI y la fuente de los datos vectoriales fue el BCN200 (Base Cartografica Numerica scale 1:200.000) del Instituto Nacional de Geografía de España.

3.3.8. Análisis estadístico

Las diferencias en las frecuencias de presencia de *V. parahaemolyticus* en diferentes lugares y épocas fueron analizadas por el test de Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher.

Las asociaciones entre los factores ambientales y la presencia de *V. parahaemolyticus* se analizaron mediante el análisis de regresión logística. Las relaciones entre la presencia de *V. parahaemolyticus* y cada uno de los parámetros ambientales incluidos en el estudio fueron inicialmente examinados por análisis de regresión logística simple. Una vez seleccionadas las variables significativas a nivel individual, se llevó a cabo un modelo de regresión logística múltiple. La probabilidad estimada y el ratio Odds (OR) fueron estimadas por análisis de regresión logística. El ratio Odds (OR) se define como la previsión del cambio de probabilidades para un aumento de una unidad de la correspondiente variable independiente. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con SPSS versión 14.0.1 (SPSS Inc.) y el nivel de significación de $P < 0,05$.

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Presencia de *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus fue detectado en 117 de 331 (35,3 %) muestras de agua de mar analizadas durante el período de estudio (Tabla 11). La incidencia de *V. parahaemolyticus* fue significativamente mayor en el área de Ferrol (48 %) que en los puertos de A Coruña y Vigo, donde la incidencia de muestras positivas fue similar (28,5 % y 31,4 %, respectivamente).

Las poblaciones patógenas de *V. parahaemolyticus* *tdh*⁺ y *trh*⁺ fueron detectadas en 21 (6,3 %) y 22 (6,6 %) muestras, respectivamente. La presencia de cepas

patógenas fue significativamente mayor en Ferrol (13% y 15% de muestras de agua de mar, respectivamente), en comparación con el puerto de A Coruña donde sólo hubo 6 muestras *tdh*⁺ (4.7%) y 7 muestras *trh*⁺ (5.5%). No se detectaron cepas *trh*⁺ en la ría de Vigo y la presencia de *tdh*⁺ de *V. parahaemolyticus* sólo fue detectada en 2 muestras (1,9 %).

Área	Punto de Muestreo	Muestras	<i>toxR</i>	<i>trh</i>	<i>tdh</i>
A Coruña	1	21	6 (28.5%)	1 (4.8%)	1 (4.8%)
	2	21	9 (42.8%)	1 (4.8%)	0 (0%)
	3	21	4 (19.0%)	0 (0%)	0 (0%)
	4	21	6 (28.5%)	1 (4.8%)	2 (9.5%)
	5	21	6 (28.5%)	2 (9.5%)	2 (9.5%)
	6	21	5 (23.8%)	2 (9.5%)	1 (4.8%)
	Total	126	36 (28.5%)	7 (5.5%)	6 (4.7%)
Ferrol	1	20	7 (35%)	3 (15%)	2 (10%)
	2	20	10 (50%)	3 (15%)	2 (10%)
	3	20	8 (40%)	2 (10%)	4 (20%)
	4	20	12 (60%)	5 (25%)	3 (15%)
	5	20	11 (55%)	2 (10%)	2 (10%)
	Total	100	48 (48%)	15 (15%)	13 (13%)
Vigo	1	21	5 (23.8%)	0 (0%)	2 (9.5%)
	2	21	5 (23.8%)	0 (0%)	0 (0%)
	3	21	5 (23.8%)	0 (0%)	0 (0%)
	4	21	5 (23.8%)	0 (0%)	0 (0%)
	5	21	13 (61.9%)	0 (0%)	0 (0%)
	Total	105	33 (31.4%)	0 (0%)	2 (1.9%)
Total		331	117 (35.3%)	22 (6.6%)	21 (6.3%)

Tabla 11. Incidencia de *V. parahaemolyticus* total y de sus poblaciones patógenas *trh*⁺ y *tdh*⁺ en diferentes sitios de muestreo durante todo el período de estudio.

NOTA: *Vibrio parahaemolyticus* "total" hace referencia a la incidencia general de *V. parahaemolyticus* en la población.

La distribución geográfica de *V. parahaemolyticus* total y patógeno en cada área durante el período del estudio fue analizado con el Sistema de Información Geográfica (SIG) (Arcgis versión 9,1) y la extensión del análisis espacial se llevo a cabo por el Instituto de Investigaciones en Sistemas, utilizando los datos vectoriales originados de BCN200 (base cartográfica, escala numérica 1:200.000) procedentes del Instituto Geográfico Nacional de España (Fig 6).

La incidencia de *V. parahaemolyticus* total en las diferentes zonas de muestreo dentro de la ría de Ferrol osciló entre 35% y 60 %, y se pudo observar que los porcentajes fueron aumentando hacia las áreas internas de la ría (Tabla 11). La mayor presencia de cepas *trh+* (25% de las muestras) fue detectada en la ensenada de Caranza (punto 4), sin embargo, la presencia de poblaciones *tdh+* (20%) fue destacada en el punto 3 (muelle internacional para los buques de carga).

En el puerto de A Coruña, la presencia de *V. parahaemolyticus* varió del 19% a 42,8 %, con una mayor incidencia en el punto 2 (muelle de pesca-Muelle del Centenario-Sur). La mayor prevalencia de cepas *trh+* se produjo en los sitios 5 y 6 (Muelle Pesquero y Deportivo de Oza), con un 9,5 % de las muestras positivas. Por otra parte, las cepas *tdh+* fueron en su mayoría aisladas de muestras procedentes de sitios adyacentes a los petroleros (sitios 4 y 5), donde fueron detectados en el 9,5 % de las muestras.

La presencia de *V. parahaemolyticus* fue menos uniforme en la ría de Vigo, con una incidencia que fue desde 23,8 % a 61,9 %. La mayor incidencia de *V. parahaemolyticus* total, fue observada en el lugar de muestreo donde la salinidad es más baja. Las poblaciones patógenas *trh+* de *V. parahaemolyticus* no fueron detectadas en esta ría y sólo dos muestras positivas de *V. parahaemolyticus* fueron *tdh+* aisladas en el sitio 1 (Fondeo de Mercantes) localizado en el área externa de la ría donde atracan los buques mercantes.

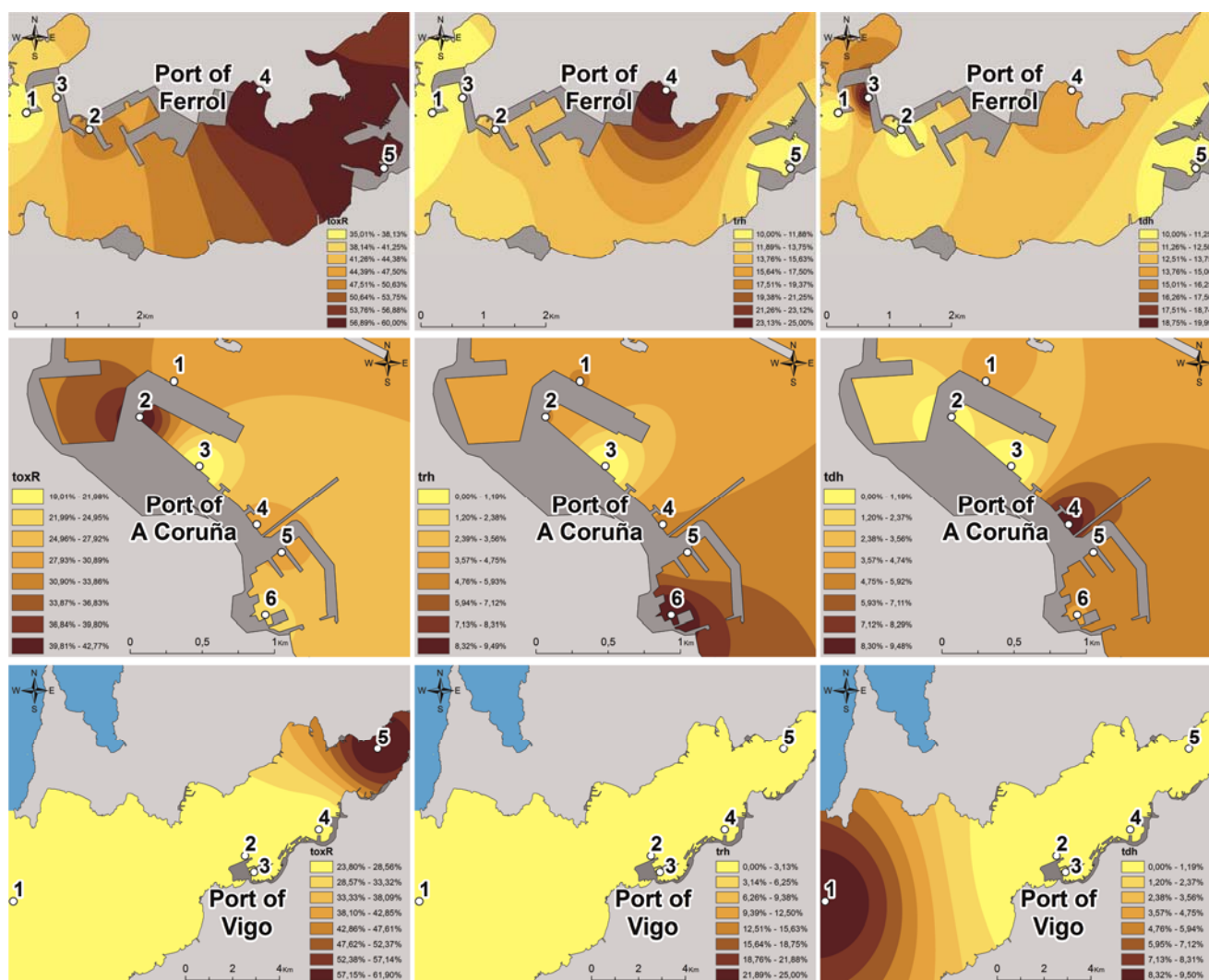


FIG 6. Mapas GIS mostrando la distribución espacial de *V. parahaemolyticus* total, *trh*+ y *tdh*+ en los puntos de muestreo en las tres áreas de estudio en Galicia.

3.4.2. Estacionalidad

V. parahaemolyticus fue detectado en las tres áreas estuáricas de Galicia incluidas en el estudio. Se observó que la presencia de *V. parahaemolyticus* fue constante durante todo el año, destacando una mayor incidencia (58.7%) y un mayor número de cepas (272) en los meses de otoño (Fig 7). Un patrón similar fue observado con especímenes *trh*+, que alcanzaron los valores más altos en Octubre (18,7 %) y en Noviembre (31,2 %). Por el contrario, la presencia de poblaciones *tdh*+ mostró un patrón de estacionalidad diferente, con una máxima incidencia en Febrero (25%), y una extraordinaria prevalencia en Ferrol, donde las muestras *tdh*+ ascendieron a 60% en ese mes. La mayor prevalencia de poblaciones patógenas de *V. parahaemolyticus* *tdh*+ en el puerto de A Coruña fue

detectada en el mes de Junio (16,6 %) y en el puerto de Vigo estuvieron restringidas a los meses de Febrero y Noviembre, con una presencia de un 10% en cada mes.

La mayor proporción de cepas *trh*⁺ se produjo en los meses de otoño, cuando fueron aisladas el 85% de estas cepas. En cambio, el 75% de las cepas *tdh*⁺ fueron detectadas en invierno y primavera, sin observarse en los meses de verano, aunque en este periodo, *V. parahaemolyticus* fue positivo en el 20% de las muestras.

La máxima incidencia de *V. parahaemolyticus* en otoño coincidió con el período de baja salinidad en las rías, con valores de 31,1 %, 31,3 % y 28.1% en Octubre, Noviembre y Diciembre, respectivamente.

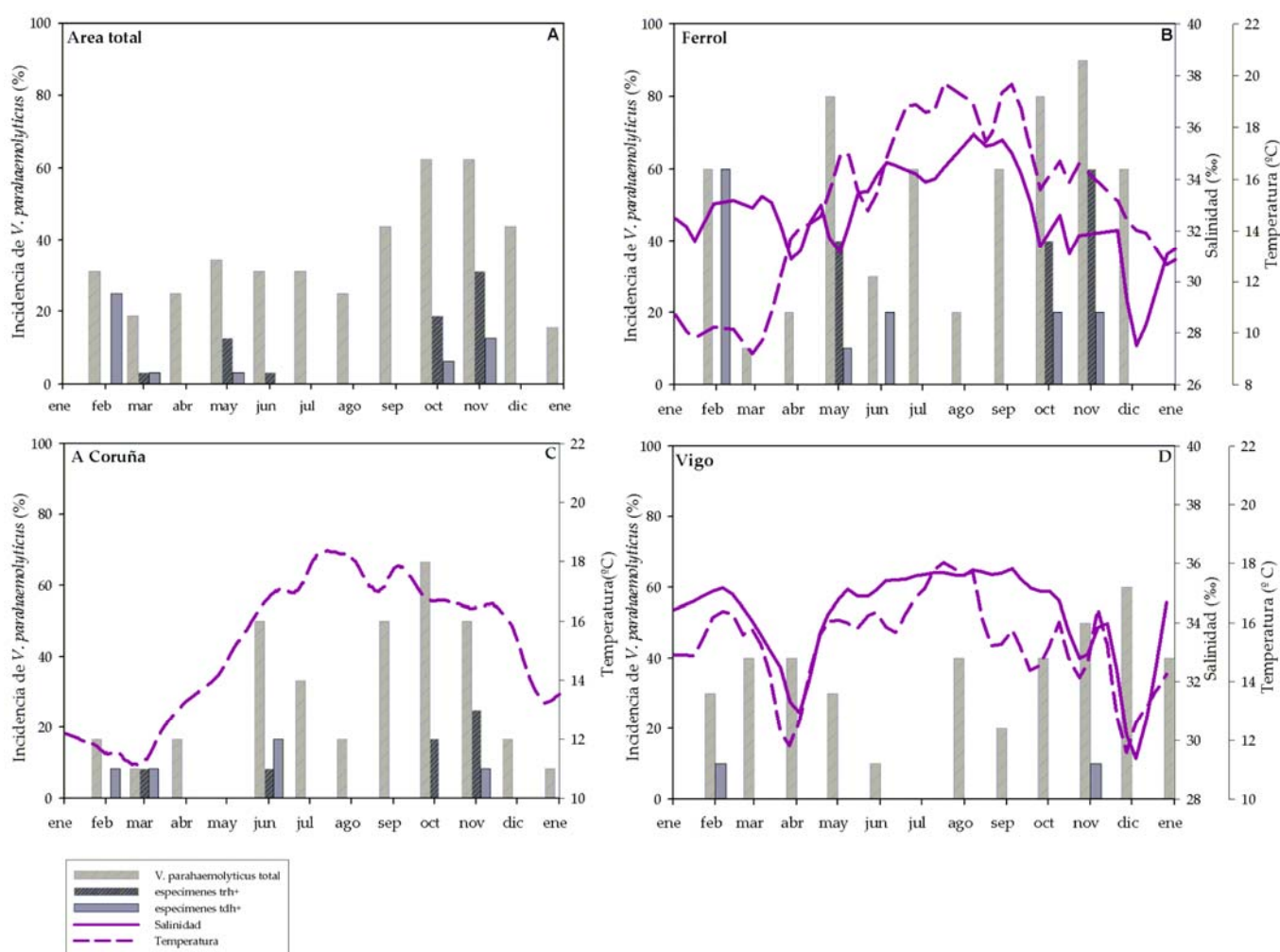


FIG 7. Incidencia global de *V. parahaemolyticus* total, *trh*⁺ y *tdh*⁺ en las tres áreas de estudio (A), y en Ferrol (B), A Coruña (C) y Vigo (D), y las variaciones de salinidad y temperatura del agua del mar en todo el período de estudio. No se obtuvieron datos de salinidad en el puerto de A Coruña.

3.4.3. Análisis estadístico

Todos los resultados de la prevalencia de *V. parahaemolyticus* obtenidos a lo largo de todo el estudio fueron integrados para su evaluación conjunta con datos medioambientales (viento, lluvia, insolación, y temperatura), oceanográficos (upwelling, temperatura y salinidad del agua de mar), y transporte marítimo.

Teniendo en cuenta el modelo de regresión logística simple, los resultados de presencia de *V. parahaemolyticus* en cada área fueron asociados con la salinidad ($P < 0,05$) y la temperatura ($P < 0,01$), con correlaciones negativas y positivas respectivamente. Ninguno de los otros parámetros se asoció significativamente con la presencia de la bacteria. En las áreas del Norte de las rías de Ferrol y A Coruña, la presencia de *V. parahaemolyticus* fue influenciada positiva y potencialmente por la temperatura atmosférica en los días previos a la recogida de la muestra. La presencia de esta bacteria estuvo también significativamente relacionada con el tráfico marítimo de buques procedentes de los países Asiáticos con los puertos de Ferrol y Vigo.

3.4.4. Caracterización de las cepas

Se seleccionaron un total de 1351 aislamientos presuntivos a partir de muestras de agua de mar analizadas. *V. parahaemolyticus* fue identificado por la presencia del gen especie-específico *Vp-toxR* en 535 aislamientos. La presencia de genes patógenos fue detectada en 94 cepas (17,6 %), con la siguiente distribución: 24 (4,5 %) con el gen *tdh*, 66 (12,3 %) con el gen *trh* y 4 (0,8 %) con ambos genes.

Una gran diversidad de serotipos y perfiles genéticos fueron observados entre las 66 cepas *trh+* /*tdh-* (Fig 8). Los análisis del serotipado identificaron 16 serogrupos diferentes, entre los cuales predominaron serotipos pertenecientes a los serogrupos O1, (16 cepas), O5 (15 cepas) y O10 (13 cepas). Los serotipos más frecuentes fueron O1:KUT y O5:K17 compuesto por 12 cepas, seguido por el O10:KUT, que fue identificado en 8 cepas. De las 33 cepas procedentes del puerto de A Coruña, tenemos que destacar un patrón idéntico de PFGE (PT8) en 11 cepas pertenecientes a los serotipos O10:KUT, O10:K71 y O1:KUT. También se observó, otro grupo compuesto por 7 cepas con serotipo O5:K17 que se agruparon en otro pulsotipo (PT26). El resto de los 15 aislamientos procedentes de este puerto, fueron diferenciados en 7 diferentes pulsotipos.

En cuanto a las 33 cepas *trh+/tdh-* obtenidas de la zona de Ferrol, se identificó una extraordinaria diversidad, con 12 serotipos diferentes distribuidos en 20 pulsotipos. El pulsotipo predominante fue el PT6, el cual incluyó cepas pertenecientes a serotipos O1 (O1:KUT, O1:K1 and O1:K56). Las 26 cepas restantes *trh+/tdh-* de la Ría de Ferrol también mostraron una alta diversidad de serotipos y patrones de restricción no relacionados. Sólo las cepas *trh+* pertenecientes al pulsotipo PT8 y PT26, grupos dominante en el puerto de A Coruña, se detectaron simultáneamente en los 2 puertos.

Con respecto a las poblaciones de *V. parahaemolyticus trh-/tdh+*, se pudo observar una gran uniformidad en la caracterización de estas 24 cepas *trh-/tdh+* detectadas en este estudio (Fig 8). Un grupo genéticamente dominante y homogéneo fue identificado entre los aislamientos *tdh+* obtenidos en los puertos de A Coruña y Ferrol. Este grupo incluyó 16 cepas pertenecientes al serotipo O4:K63 que fueron agrupados en pulso tipos PT1, PT2 y PT3. Estas cepas fueron detectadas durante el periodo de estudio, a excepción de los meses de verano, donde no se observó ni especímenes *trh+* ni *tdh+*. Tres cepas aisladas en Ferrol en los meses de invierno fueron agrupadas en un pulso tipo adicional (PT34). El resto de las cepas *tdh+* (5 cepas) presentaron diversos serotipos y patrones de restricción no relacionados.

En la Ría de Vigo, se encontraron dos cepas *trh-/tdh+* con serotipo O2:K28 y O2:KUT, las cuales compartieron un patrón exclusivo de PFGE y completamente diferente al resto de las cepas de este estudio.

Todas las cepas *trh- /tdh+* fueron negativas en los análisis del grupo-especifico PCR (GS-PCR), por lo tanto, ninguna de estas cepas pertenece al clon pandémico de *V. parahaemolyticus* (Matsumoto et al., 2000).

Las 4 cepas *trh+/tdh+* que fueron aisladas durante el periodo del estudio en la ría de Ferrol, presentaron distintos serotipos y perfiles genéticos no relacionados entre sí. Para nuestro conocimiento, estas cepas ambientales, representan la primera evidencia en Europa de este genotipo, ya que no se detectó hasta este momento, ninguna cepa con estas características.

Una comparación de todas las cepas *trh*⁻/*tdh*⁺ y *trh*⁺/*tdh*⁻ obtenidas en este estudio con cepas representantes de *V. parahaemolyticus* patógeno aisladas en diferentes zonas del mundo (Perú, Chile, Taiwán, Corea, India, Laos, Japón, Estados Unidos, Bangladesh, Tailandia y Reino Unido) mostraron que las cepas de Galicia presentan patrones de restricción diferentes, con lo que no guardan relación con las cepas patógenas de otras áreas geográficas (Fig 9 y 10) y también difieren de las cepas patógenas de este microorganismo aisladas de infecciones humanas durante los últimos años en España.

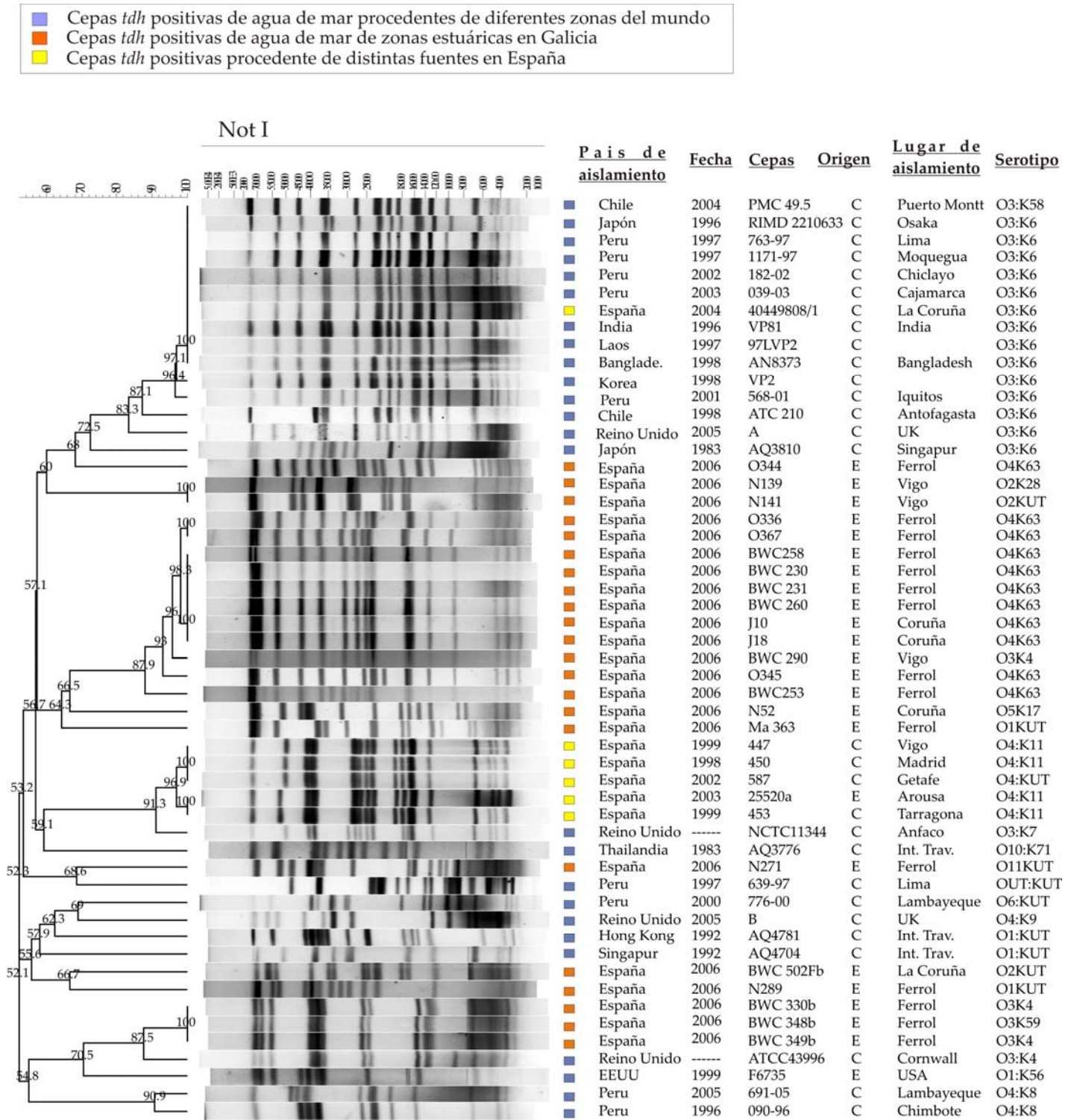


FIG 9. Comparación de la relación genética de los patrones de PFGE de las cepas *V. parahaemolyticus* *tdh*⁺ obtenidos en este estudio con las cepas de *V. parahaemolyticus* *tdh*⁺ de diferentes partes del mundo. Los números en la parte superior del gráfico indican los tamaños moleculares en kbp.

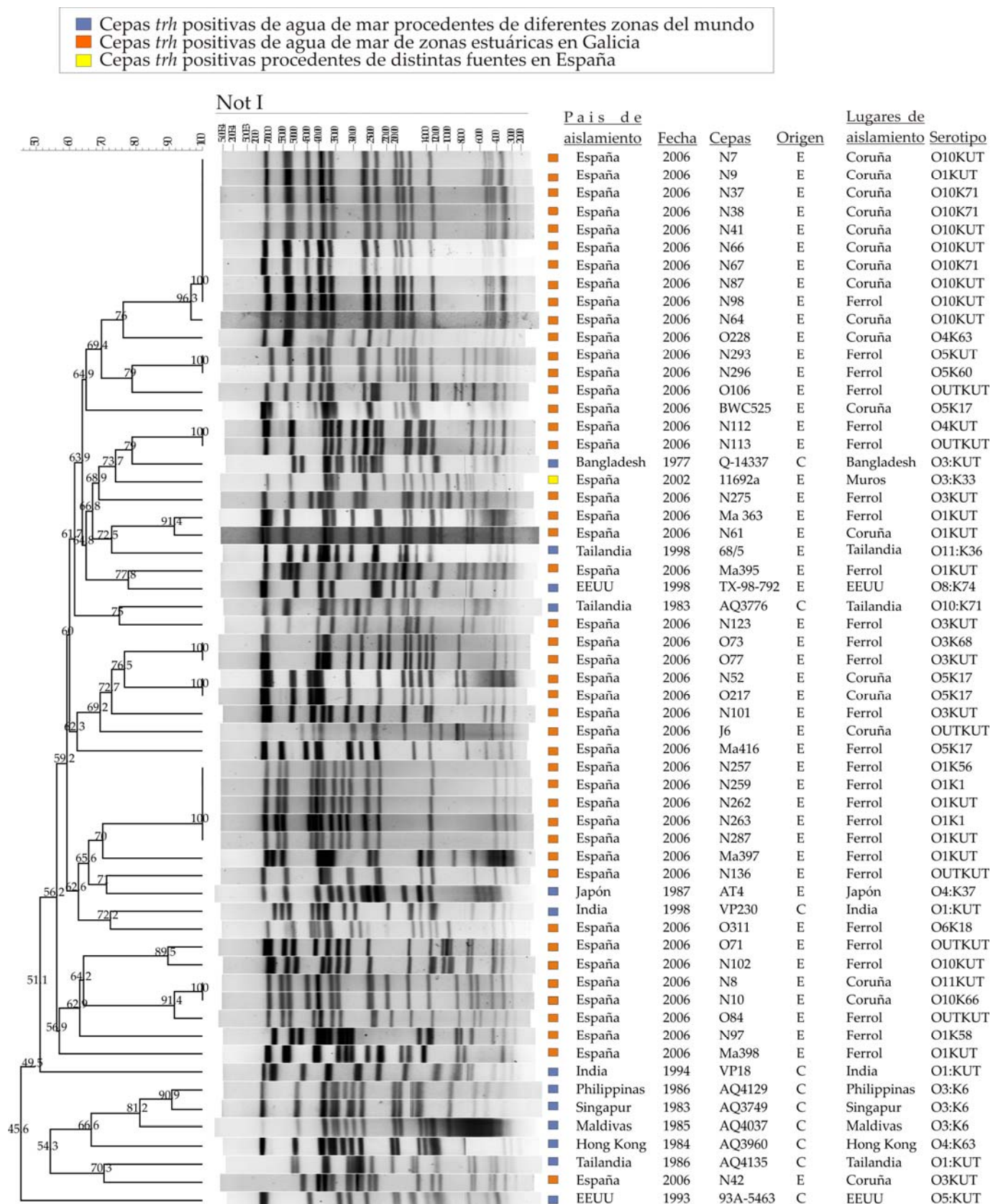


FIG 10. Comparación de la relación genética de los patrones de PFGE de las cepas *V. parahaemolyticus trh+* obtenidos en este estudio con las cepas de *V. parahaemolyticus trh+* de diferentes partes del mundo. Los números en la parte superior del gráfico indican los tamaños moleculares en kbp.

3.5. DISCUSIÓN

La detección de especímenes patógenos de *V. parahaemolyticus* en el medio marino de Galicia no ha sido suficientemente estudiada. La presencia de *V. parahaemolyticus* se ha investigado en un estudio previo en 26 sitios ubicados en las cuatro principales rías de Galicia. Los resultados obtenidos de esta investigación han sido limitados, debido a que sólo se aislaron dos cepas *trh-/tdh+* procedentes de una sola muestra de mejillón en un análisis de 1.551 muestras y en la caracterización de más de 2.320 cepas obtenidas durante un periodo de tres años (Martinez-Urtaza et al., 2008b).

El bajo número de cepas patógenas encontradas en las áreas centrales de las rías, contrasta con los resultados procedentes de las aguas estuáricas de los principales puertos de Galicia, donde se identificaron 66 cepas *trh+/tdh-* y 24 cepas *trh-/tdh+* en 331 muestras de agua de mar. La abundancia de cepas *trh+/tdh-* y *trh-/tdh+* en las costas, denota un cambio importante en la estructura de la población de *V. parahaemolyticus* respecto a la que fue previamente observada en el ambiente marino de esta región, con especímenes patógenos como componentes habituales de las poblaciones ambientales de *V. parahaemolyticus* a lo largo de la costa.

La presencia total de *V. parahaemolyticus* en las áreas centrales de las Rías Baixas (Martinez-Urtaza et al., 2008b) fue más baja que en las aguas de mar recogidas en las zonas costeras incluyendo los puertos internacionales de Galicia, con una incidencia de 12.5% y 35.3 %, respectivamente. La prevalencia de *V. parahaemolyticus* en las rías está estrechamente asociada con los cambios de salinidad, que es el factor determinante en la estacionalidad y en el área de distribución de este organismo en la zona central de las rías. Al igual que en el estudio anterior realizado en las zonas centrales de las Rías Baixas de Galicia, la salinidad ha sido un factor importante por presentar un efecto similar en este estudio, con incidencias de *V. parahaemolyticus* durante el otoño (de Septiembre a Diciembre), excediendo el 50% y coincidiendo con los meses donde la salinidad es la más baja. La influencia de la salinidad también fue estudiada en la distribución de *V. parahaemolyticus* entre y dentro de los puertos. La mayor incidencia de *V. parahaemolyticus* fue registrada en Ferrol, puerto donde la salinidad es más baja (28 ppt), y predominantemente se detectó en las zonas internas de la ría, donde el agua es menos salina. Una situación similar fue observada en Vigo, donde la incidencia más alta se produjo en el lugar de

muestreo más interno de la ría de Vigo, en el cual también se presentaron los valores de salinidad más bajos entre los puntos de muestreo del puerto de Vigo.

Sin embargo, los resultados y conclusiones obtenidos en las áreas centrales de las Rías Baixas, contrastan con los resultados de este estudio sobre la presencia de *V. parahaemolyticus* en zonas estuáricas, que fue influenciada positivamente por la temperatura del agua de mar. Aunque las temperaturas de agua de mar más altas fueron registradas durante los meses de verano en estas zonas estuáricas, la presencia de *V. parahaemolyticus* durante este periodo fue inferior a la media, probablemente porque la salinidad (> 34 ppt) fue desfavorable para la presencia de esta bacteria.

La principal influencia de la temperatura se produjo en combinación con la reducción de la salinidad durante el otoño. En estos meses, la temperatura del agua de mar continuó siendo alta, llegando a alcanzar un máximo de $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ y los valores de salinidad disminuyeron bruscamente en el comienzo de la temporada de lluvias. Por el contrario, en el mes de Diciembre, aunque la salinidad se mantuvo baja, la presencia de *V. parahaemolyticus* disminuyó progresivamente debido a un descenso drástico de la temperatura de agua de mar ($13\text{ }^{\circ}\text{C}$). En el mes de Enero se alcanzaron niveles mínimos de *V. parahaemolyticus*, ya que las temperaturas descendieron por debajo de $13\text{ }^{\circ}\text{C}$, una temperatura crítica para la presencia de *V. parahaemolyticus* en la columna de agua (Kaneko and Colwell, 1973; Kaneko and Colwell, 1975).

La estacionalidad de *V. parahaemolyticus* observada en Galicia, contrasta notablemente con las variaciones temporales en otras partes del mundo, donde la presencia de este organismo muestra su máxima incidencia en los meses de verano en concurrencia con las temperaturas del agua más elevadas y es casi indetectable en periodos de invierno y otoño (Kaneko and Colwell, 1973; Kaneko and Colwell, 1978; Kelly and Stroh, 1988; DePaola et al., 2003). La mayor presencia de poblaciones de *V. parahaemolyticus* en los meses cálidos en áreas estuáricas de otras regiones ha sido atribuida a la existencia de bajas salinidades (Kaneko and Colwell, 1975; Kelly and Stroh, 1988; DePaola et al., 2003; Bauer et al., 2006; Deepanjali et al., 2006; Parveen S. et al., 2008), las cuales son óptimas para el desarrollo de *V. parahaemolyticus* a lo largo del año, dejando la dinámica de poblaciones bajo la única influencia de las oscilaciones de temperatura del agua del mar (Martinez-Urtaza et al., 2008b).

Este estudio reveló la presencia de especímenes *trh+* de *V. parahaemolyticus* en la mayoría de las zonas investigadas en la costa del norte de Galicia (A Coruña y Ferrol), contrastando con la ausencia total en la ría de Vigo. La ausencia de aislamientos *trh+* en las rías localizadas en el Sur de Galicia fue previamente descrita durante los tres años de un estudio anterior (Martínez-Urtaza et al., 2008b), en la que no se encontraron cepas *trh+*. La presencia dominante de los aislamientos *trh+* en las áreas de muestreo de las rías del Norte puede sugerir que estas cepas prefieren las aguas frías del Norte en lugar de las aguas más cálidas del Sur. De todas las cepas caracterizadas de A Coruña y de Ferrol, el 15% y el 19%, fueron *trh+* respectivamente con una máxima presencia en Noviembre, cuando las cepas *trh+* excedieron el 40 % en A Coruña y el 30% en Ferrol. En Noviembre, las cepas *trh+* fueron identificadas en el 60% de las muestras de agua de mar de Ferrol. La presencia significativa de las poblaciones *trh+* como un importante componente de las poblaciones ambientales de *V. parahaemolyticus* detectadas en el norte de Galicia es consistente con observaciones previas obtenidas de otros estudios llevados a cabo en el norte de Europa. Dos aislamientos *trh+* fueron recuperados del canal de Inglaterra y de la costa Atlántica de Francia en un estudio llevado a cabo en 1999 (Hervio-Heath et al., 2002). Por otra parte, otras investigaciones registraron una presencia de 15 % de cepas *trh+* procedentes de aislamientos de *V. parahaemolyticus* obtenidos del sudoeste de Francia (Robert-Pillot et al., 2004). También se han detectado 4 cepas *trh+* en la costa de Noruega durante 3 años, representando alrededor del 3% del total de los aislamientos (Bauer et al., 2006).

En contraste con los resultados obtenidos en el norte de Europa, los aislamientos *trh+* no fueron detectados en el mar Mediterráneo, donde sólo se identificaron cepas *tdh+* procedentes de fuentes ambientales (Baffone et al., 2006; Caburlotto et al., 2008). La diferente distribución geográfica de poblaciones *trh+* y *tdh+* puede sugerir una afinidad mediada por la temperatura, afectando su distribución a lo largo de la costa Europea, con especímenes *trh+* dominando en las aguas frías y *V. parahaemolyticus* *tdh+* distribuidos entre las aguas cálidas en el Sur. En este contexto, la coexistencia de poblaciones *trh+* y *tdh+* encontradas en la costa de Galicia podría indicar la existencia de un área de transición con un clima moderado entre las aguas calientes del mar Mediterráneo y las aguas frías del Norte de Europa. La costa Atlántica de la Península Ibérica probablemente representa el límite norte de la distribución geográfica de poblaciones *tdh+* en Europa, coincidiendo con el límite más meridional para la presencia de poblaciones *trh+*. Un rango similar

biogeográfico es ampliamente observado en muchas otras especies de zooplankton, como los copépodos *Temora stylifera* and *Oncaea mediterranea* (Razouls et al., 2005) o moluscos, como el mejillón del Mediterráneo *Mytilus galloprovincialis* (Seed, 1992). Estas especies de aguas cálidas están presentes a lo largo del Mar Mediterráneo y llegan a la costa norte de la Península Ibérica donde ocurre la transición a otras especies de aguas frías que predominan en el norte de Europa.

La mayoría de las cepas *trh+* fue limitada a los meses de otoño, donde fue identificado el 85% del total de las cepas, con apenas detección en los meses de invierno y verano. Este patrón mostró una variación estacional paralela a la observada para *V. parahaemolyticus* total, alcanzando su máxima incidencia en otoño y una importante presencia en primavera. Por el contrario, un patrón estacional diferente fue observado para los especímenes de *V. parahaemolyticus tdh+*. Casi el 70% de las cepas *tdh+* fueron aisladas en invierno y primavera. No se detectaron aislamientos *tdh+* en los meses de verano, aunque un 20% de las muestras fueron positivas para *V. parahaemolyticus* en este periodo (Julio-Septiembre). El predominio de las cepas *tdh+* en los meses más fríos del año contrasta con la bibliografía previamente descrita, distinguiendo su incidencia en aguas cálidas y con un gran dominio de infecciones y brotes de *V. parahaemolyticus* durante los meses de verano en muchas partes del mundo (Daniels et al., 2000b; Gonzalez-Escalona et al., 2005; McLaughlin et al., 2005; Martinez-Urtaza et al., 2008). DePaola y col. (DePaola et al., 2003), detectaron un predominio de cepas *tdh+* en la costa del Golfo de EE.UU. en el invierno. Este incremento en el ratio de cepas *tdh+* en ostras durante el invierno fue debido a una reducción de las poblaciones de *V. parahaemolyticus* total y no a un aumento real de cepas patógenas durante estos meses. Por el contrario, las cepas *tdh+* en Galicia mostraron dos periodos de detección diferentes, uno en otoño, en paralelo con el aumento general de las poblaciones de *V. parahaemolyticus* total y un segundo periodo en invierno que coincidió con un aumento específico en las cepas *tdh+*, que alcanzaron el 21% del total de los aislamientos caracterizados en este periodo. Los factores que favorecen la extraordinaria presencia de especímenes *tdh+* en los meses más fríos del año siguen siendo desconocidos, ya que no se observaron condiciones ambientales específicas.

Las infecciones de *V. parahaemolyticus* en España, y en toda Europa han sido exclusivamente asociadas con cepas *tdh+* (Martinez-Urtaza et al., 2004), y no se

han descrito hasta la fecha, infecciones relacionadas con *V. parahaemolyticus* *trh*⁺. Esto contrasta claramente con el dominio de poblaciones *trh*⁺ en el ambiente marino. Además las características serológicas y genéticas de las cepas ambientales *tdh*⁺ no estuvieron relacionadas con el clon clínico dominante O4:K11 en fuentes clínicas en España (Martinez-Urtaza et al., 2004). La incongruencia entre las cepas con características virulentas que prevalecen en el medio ambiente y aquellas aisladas de infecciones en esta zona proporciona un nuevo contexto para este patógeno que requiere más investigación.

La aparición de un brote en el 2004 en el puerto de A Coruña, producido por aislamientos del clon pandémico O3:K6, asociados con productos del mar, fue considerado como una evidencia preliminar en el rol de la actividad de los barcos en la introducción de nuevos clones patógenos en humanos en Galicia (Martinez-Urtaza et al., 2005). Este estudio se llevó a cabo para evaluar el posible impacto del transporte marítimo internacional en la introducción de poblaciones patógenas de *V. parahaemolyticus* en las zonas costeras, incluyendo los tres principales puertos de Galicia, suponiendo una ausencia o escasa presencia de cepas patógenas en el medio marino de Galicia, en base a la información disponible de estudios previos (Martinez-Urtaza et al., 2008b). Inesperadamente, los resultados obtenidos en este estudio han aportado una nueva visión de la composición y dinámica de las poblaciones de *V. parahaemolyticus* en esta zona, mostrando que las poblaciones patógenas constituyen un componente natural de las poblaciones ambientales de este organismo en los hábitats costeros. La presencia de grupos idénticamente genéticos en distintas áreas en diferentes periodos del año, sugiere que estas poblaciones son endémicas en la zona. Sin embargo, paralelamente a estas conclusiones, el estudio ha proporcionado algunas ideas preliminares que podrían vincular la presencia de algunas cepas patógenas con el transporte marítimo. La presencia de *V. parahaemolyticus* en Ferrol y en Vigo estuvo positivamente y significativamente asociada con el transporte marítimo procedente de Asia, pero no se encontró ninguna relación con la entrada de buques o barcos de otros continentes. Además, las cepas *tdh*⁺ se detectaron principalmente en los 3 puertos de Galicia, en los puntos de muestreo donde llegan buques que viajan de Asia: punto 3 en el puerto de Ferrol (Muelle para buques de carga de comercio internacional), punto 4 y 5 en el puerto de A Coruña (muelle de petroleros), y el punto 1 en el puerto de Vigo (lugar de atraque de los buques mercantes). Del mismo modo, algunas cepas con perfiles genéticos únicos fueron detectadas en estos sitios de intenso transporte

marítimo. Aunque ninguno de los aislamientos de *V. parahaemolyticus* fue relacionado con ninguna de las cepas internacionales incluidas en el análisis, esta comparación debería ser considerada poco informativa, ya que la mayoría de cepas foráneas incluidas en la evaluación son de origen clínico y obtenidas de un pequeño número de países, por lo tanto son poco representativas de la gran variedad de poblaciones existentes en las áreas costeras donde pudieron ser recogidas las aguas de lastre.

CAPÍTULO 2

-Incidencia y dinámica de *Vibrio parahaemolyticus* en aguas oceánicas de Galicia y su asociación con los factores ambientales-

4. Incidencia y dinámica de *Vibrio parahaemolyticus* en aguas oceánicas de Galicia y su asociación con los factores ambientales

4.1. RESUMEN

El ciclo de vida de *Vibrio parahaemolyticus* ha sido tradicionalmente asociado con áreas estuáricas caracterizadas por salinidades moderadas y temperaturas de agua de mar cálidas. Recientes evidencias sugieren que la distribución y dinámica de poblaciones de *V. parahaemolyticus* puedan ser debidas a la existencia de un transporte oceánico de comunidades de este organismo mediadas por zooplancton. Para evaluar esta posibilidad, la presencia de *V. parahaemolyticus* fue analizada mensualmente en la columna de agua de zonas no estuáricas de Galicia por PCR durante un periodo de 18 meses. El análisis de las muestras de zooplancton, mejillón y agua mostraron que la presencia de *V. parahaemolyticus* en áreas no estuáricas estuvo exclusivamente asociada con el zooplancton y fue detectado en el 80% de las muestras. La influencia de los factores ambientales se calculó por medio del modelo de regresión logística que reveló que la abundancia y estacionalidad de *V. parahaemolyticus* fue favorecida por la concurrencia de los periodos de downwelling que promueven las comunidades de zooplancton. Estos resultados confirman que las aguas oceánicas pueden ser hábitats naturales para *V. parahaemolyticus*, incluyendo las cepas con características de virulencia. Adicionalmente, poblaciones relacionadas genéticamente fueron encontradas en el zooplancton y en estuarios dispersos a lo largo de 1500km. Esto sugiere que el zooplancton puede operar como vehículo para la dispersión de las poblaciones de *V. parahaemolyticus*, conectando regiones y hábitats distantes y produciendo impactos en la demografía de comunidades locales y en la propagación de enfermedades causadas por *Vibrio*.

4.2. INTRODUCCIÓN

El género *Vibrio* está compuesto por más de 50 especies reconocidas, que son habitantes naturales de una amplia gama de hábitats acuáticos. De todas estas especies, *V. parahaemolyticus* ocupa ambientes naturales con condiciones de salinidad moderada y temperaturas cálidas, y su ciclo de vida ha sido asociado a los sistemas estuáricos (Kaneko and Colwell, 1973; Kaneko and Colwell, 1975; Kaneko and Colwell, 1978; Joseph et al., 1982). La salinidad, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes de los estuarios proporcionan un ambiente propicio para las poblaciones de *V. parahaemolyticus* (Joseph et al., 1982) y las variaciones de estos parámetros son fundamentales en la modulación del ciclo de vida de este organismo. Los gradientes de salinidad en estas áreas son uno de los factores que configuran los límites de distribución de *V. parahaemolyticus* en los hábitats costeros (DePaola et al., 2000; DePaola et al., 2003; FDA, 2005; Thomas et al., 2006; Martinez-Urtaza et al., 2008b). También está generalmente aceptado que el ciclo anual de *V. parahaemolyticus* en estas áreas de salinidad moderada se rige por los cambios estacionales en la temperatura (Joseph et al., 1982; Thompson et al., 2004). Por otra parte, la interacción con los organismos planctónicos, principalmente copépodos, juega un papel fundamental en la ecología de las poblaciones pelágicas de *Vibrio*. Los copépodos representan la mayor reserva natural de vibrios en aguas estuáricas (Colwell, 1996) y la quitina presente en copépodos proporciona una serie de ventajas para una mejor capacidad de supervivencia en el medio ambiente de estos organismos, tales como la disponibilidad de alimento, la tolerancia al estrés y la protección (Dawson et al., 1981; Huq et al., 1983; Amako et al., 1987; Dumontet et al., 1996; Pruzzo et al., 2008).

Considerando la afinidad ecológica de *V. parahaemolyticus* por ambientes salobres, se ha supuesto que la presencia de este organismo es escasa en aguas no estuáricas, debido a que estas áreas se caracterizan por tener temperaturas bajas del agua, salinidades altas y baja concentración de nutrientes (Joseph et al., 1982). Sin embargo, las corrientes oceánicas han sido propuestas como vehículo para la propagación de enfermedades humanas causadas por *Vibrio* a través de la dispersión de especímenes patógenos unidos al zooplankton (Colwell, 1996; Lipp et al., 2002; Halpern et al., 2008; Pruzzo et al., 2008). Recientes evidencias han demostrado la relación entre la aparición de brotes epidémicos causados por *V. parahaemolyticus* y la entrada de aguas oceánicas de origen tropical en ambientes costeros (Baker-Austin et al., 2010; Martinez-

Urtaza et al., 2010). Un claro ejemplo fue la aparición y dispersión de infecciones en Perú, España, Chile y Alaska que se produjeron al mismo tiempo que la llegada de aguas oceánicas calientes a lo largo de la costa (Martinez-Urtaza et al., 2008; Ansedo-Bermejo et al., 2010; Baker-Austin et al., 2010; Martinez-Urtaza et al., 2010), observando, en paralelo, un incremento en la presencia atípica de zooplancton en aguas calientes (Baker-Austin et al., 2010; Martinez-Urtaza et al., 2010). La existencia de un mecanismo para la migración oceánica de las poblaciones de *V. parahaemolyticus* implicaría que esta bacteria pudiera persistir en aguas oceánicas durante largos periodos de tiempo, y pudiera ser transportada a través de los océanos bajo condiciones ecológicas adversas. Las comunidades de zooplancton pueden proporcionar una plataforma para el desplazamiento, a largas distancias, de las poblaciones de *Vibrio* de zonas estuáricas. Las asociaciones de *Vibrio* con el zooplancton podrían aportar una protección contra el estrés y otros factores adversos asociados con estos ambientes salinos y fríos y una provisión de alimentos para la supervivencia (Martinez-Urtaza et al., 2008). Por otra parte, debido al comportamiento característico del zooplancton (Olson et al., 1994; Genin et al., 2005), el transporte de *Vibrio* mediado por estos organismos podría representar un mecanismo para la agregación de especímenes de *Vibrio* en zonas oceánicas a altas densidades, aspecto que puede ser imprescindible para conseguir la cantidad de organismos patógenos necesarios para causar infección (FDA, 2005).

Adicionalmente a los aspectos ecológicos, el transporte de las poblaciones de *V. parahaemolyticus* en diferentes regiones y continentes, abre la posibilidad de que las poblaciones locales de *Vibrio* pueden ser vulnerables a invasiones periódicas de poblaciones foráneas originadas en áreas distintas. En ausencia de las barreras de dispersión, las poblaciones de *V. parahaemolyticus* locales estarían expuestas a mezclarse, frecuentemente, con diferentes poblaciones asociadas al zooplancton, lo que puede resultar un obstáculo para la especialización de nichos, como fue recientemente sugerido para las poblaciones de *Vibrio* procedentes de diferentes microbiomas (Hoffmann et al., 2010; Preheim et al., 2011).

El objetivo de este capítulo fue investigar la presencia y abundancia de *V. parahaemolyticus* en áreas oceánicas (zonas alejadas de la costa), en el Noroeste de España y determinar la asociación de las comunidades de zooplancton, en cuanto a su presencia y estructura poblacional de *V. parahaemolyticus* en estas

zonas. Además, la influencia de los factores bióticos y abióticos en el patrón estacional de *V. parahaemolyticus*, fue analizada mediante el análisis de Pearson y el modelo de regresión logística para determinar qué factores tienen una influencia importante en la ecología de *V. parahaemolyticus* en ambientes no estuáricos. Finalmente, también fueron investigadas las relaciones potenciales de las poblaciones de *V. parahaemolyticus* oceánicas y las comunidades de zonas estuáricas.

4.3. MATERIAL Y MÉTODOS

4.3.1. Diseño del Estudio

Este estudio se llevó a cabo en aguas no estuáricas de la Ría de Vigo, la ría más meridional de Galicia localizada en la costa occidental atlántica de España cerca de la frontera portuguesa (Fig 11). Se ha investigado la presencia y abundancia de *V. parahaemolyticus* en muestras de agua, zooplancton y mejillón en dos puntos durante un periodo de 18 meses, localizados en: punto 1 (42 ° 12,8 'N y 8° 51' W, 39 m de profundidad), en el exterior de la ría, y el punto 15 (42° 13,3 'N y 8 ° 47,7' W, 29 m de profundidad), situado en la desembocadura de la ría.

Las muestras fueron recogidas mensualmente entre Julio de 2005 a Diciembre de 2006, en coordinación con el programa de muestreo de zooplancton de la Ría de Vigo realizado por el Instituto Español de Oceanografía. Para el muestreo de zooplancton se utilizaron redes tipo BONGO de 40 cm. de diámetro de boca, equipadas con mallas de 200 µm para la recolección selectiva de mesozooplancton (plancton cuyo rango de tamaño es de 200 µm a 2 mm.). Los arrastres fueron oblicuos desde profundidades cercanas al fondo hasta la superficie. Las muestras se conservaron vivas en frascos esterilizados con agua de mar y fueron trasladadas hasta el laboratorio para su posterior análisis.

Las muestras de agua de mar (150 ml,) se recogieron en los mismos puntos de muestreo que el zooplancton y a profundidades de 0, 5 y 10 metros. El agua de mar fue recolectada empleando botellas de inmersión Nassen y transferidas a recipientes de plástico estériles. Las muestras de moluscos (1 kilo por muestra), procedieron de las bateas de mejillón más próximas al punto 15 de muestreo, localizadas a 42° 14,5' N y 8° 48' O y también fueron recogidas a diferentes alturas: superficie, 5 y 10 m. Todas las muestras de zooplancton, agua y mejillón fueron transportadas para su análisis en el laboratorio.

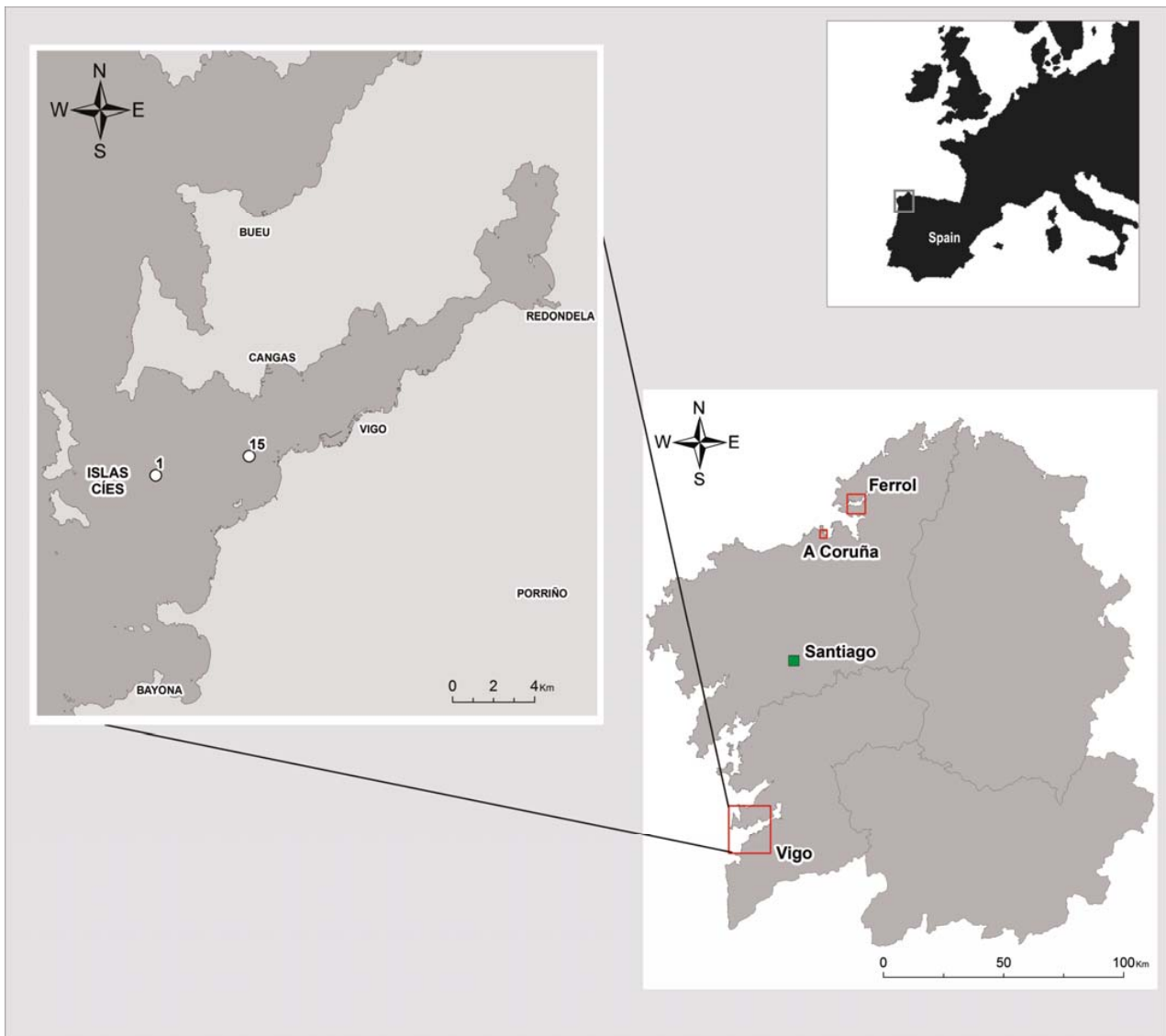


FIG 11. Localización de los puntos de muestreo en la Ría de Vigo de Galicia.

Las variables ambientales fueron registradas de forma paralela a la recolección de muestras, utilizando un dispositivo CTD (conductividad, temperatura, y profundidad).

La productividad biológica en esta área fue estimada por los valores diarios de upwelling para el punto con coordenadas $10^{\circ} 30' W$, $42^{\circ} 30' N$ con valores de 6h de afloramiento del Laboratorio Ambiental de la Pesca del Pacífico (National Oceanic and Atmospheric Administration, Pacific Grove, CA).

4.3.2. Análisis de *Vibrio parahaemolyticus*

La presencia de *V. parahaemolyticus* en el agua de mar fue analizada en base al método estándar ISO 8914 (ISO 8914, 1990) modificado de acuerdo a Blanco-Abad y colaboradores (Blanco-Abad et al., 2009). Un volumen de 150 ml de cada muestra de agua de mar fue filtrada con una bomba de vacío utilizando filtros de nitrato de celulosa estériles de 0.45 µm (Sartorius) (Sartorius, Göttingen, Alemania), y cada filtro fue colocado posteriormente en 225 ml de agua peptonada alcalina (APW). Después de la incubación a 37 °C durante 16-18 h, se analizaron alícuotas de un mililitro (ml) de caldo de enriquecimiento por PCR. Adicionalmente, las alícuotas fueron sembradas en placas de agar de tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS) (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) y *Vibrio* CHROMagar (CHROMagar Microbiology, París, Francia) e incubadas durante 16-18 h a 37 °C.

El mesozooplankton fue filtrado a través de un tamiz estéril de malla de acero inoxidable con dos mallas de 200 y de 50 micras. Todo el zooplankton retenido en los tamices se lavó con agua de mar estéril, se pesó y fue dividido en dos fracciones que se analizaron de forma independiente. Con respecto al molusco, entre 15 y 20 mejillones por muestra fueron seleccionados y lavados con agua potable. Una vez secos, estos mejillones se abrieron con un cuchillo estéril y el contenido de los mismos (carne y líquido intervalvar) se recogió en un recipiente estéril. Las muestras de zooplankton y mejillón fueron analizadas por el método del número más probable (NMP) siguiendo el procedimiento del BAM (Elliot et al., 1992), con las modificaciones descritas por Blanco-Abad y col. (Blanco-Abad et al., 2009). Cada muestra fue diluida 1:10 en caldo de APW y homogenizada en un stomacher. Un total de 10 ml de la dilución 1:10 de APW (que contiene 1 g de la muestra), 1 ml de las diluciones 1:10 y 1:100 fueron inoculadas en los tres tubos de tres series del NMP e incubadas a 37 °C durante 18 a 24 h. Después de la incubación, los caldos de APW fueron analizados simultáneamente por PCR y sembrados en placas de TCBS y CHROMagar *Vibrio* con una posterior incubación durante 16-18 h a 37 °C. Entre tres y cinco colonias presuntivas de *V. parahaemolyticus* procedentes de estos medios fueron seleccionadas al azar de cada placa y fueron sembradas e incubadas en TSA al 2% de NaCl e incubadas a 37 °C durante 24 h antes del análisis de PCR.

4.3.3. Análisis por PCR y Caracterización de cepas

Las alícuotas de los caldos de APW y las cepas aisladas durante todo el estudio se utilizaron para la extracción de DNA. La extracción de DNA genómico se realizó por medio de procedimientos estándar utilizando la resina Chelex de acuerdo con Blanco-Abad y colaboradores (Blanco-Abad et al., 2009). Un ml de caldo fue centrifugado a 2.000 rpm durante 2 min. El sobrenadante fue trasladado a un nuevo tubo y centrifugado nuevamente a 10.000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y el consiguiente pellet fue resuspendido en 300 µl de 1xTE buffer (10 mM Tris pH8, 0,1 mM EDTA) y centrifugado nuevamente a 12.000 rpm durante 7 min. Después de que el sobrenadante fuera desechado, el sedimento fue resuspendido con 300 µl de Chelex al 5% (Biorad, Hercules, California) y calentado a 56 °C durante 20 min. Con el fin de lisar las células, la suspensión fue hervida a 100 °C durante 10 min y se puso de inmediato en el hielo durante 2 min. El lisado se centrifugó a 13.000 rpm a 4 °C durante 5 min, y el sobrenadante obtenido que contenía DNA fue transferido a un tubo nuevo y almacenado a -20 °C hasta su uso para análisis de PCR.

La presencia de *V. parahaemolyticus* en caldos y la confirmación de las colonias fueron detectadas mediante el uso de los genes específicos de *V. parahaemolyticus* *Vp-toxR*, de acuerdo con el protocolo de PCR descrito por Kim y col. (Kim et al., 1999). La presencia de genes *tdh* y *trh* (genes relacionados con la virulencia), tanto en caldo como en cepas, se determinó mediante ensayos de PCR independientes para cada gen, de acuerdo con Tada y col. (Tada et al., 1992). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador PTC 200 (MJ Research, South San Francisco, California). Todos los productos de PCR fueron verificados por electroforesis en geles de agarosa al 1,6% (agarosa tipo II, Sigma-Aldrich, EE.UU.) y se fotografiaron con un transiluminador UV Alpha Innotech 2200 (Alpha Innotech, San Leandro, California). Las cepas que no presentaron amplificación del gen *Vp-toxR* se consideraron negativa para *V. parahaemolyticus* y no fueron sometidas a análisis de los genes *tdh* y *trh*. Las cepas de referencia AQ4037 (*trh*+/*tdh*-), ATCC43996 (*tdh*+/*trh*-) y VP81 (cepa pandémica, *trh*-/*tdh*+) se utilizaron como controles en todas las pruebas bioquímicas y los ensayos de PCR.

Todos los aislamientos positivos para el gen *tdh* y *trh* fueron sometidos a la serotipificación por pruebas de aglutinación con antisueros específicos de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Denka-Seiken, Tokio, Japón), y al análisis electroforético de campo pulsante, descrito previamente (Martinez-Urtaza et al., 2004). El dendrograma circular fue generado por el software BioNumerics (Matemáticas Aplicadas, Sint-Martens-Latem, Bélgica) y dibujado con el paquete de software iTOL (Letunic and Bork, 2007).

4.3.4. Análisis estadístico

Las diferencias en las frecuencias de presencia de *V. parahaemolyticus* en diferentes lugares y épocas fueron evaluadas por el test de Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher.

Las asociaciones entre los factores ambientales y la abundancia de *V. parahaemolyticus* se analizaron inicialmente por el coeficiente de correlación de Pearson. Los factores ambientales que fueron significativos con la presencia de *V. parahaemolyticus* en diferentes muestras y aquellos relacionados con el recuento de *V. parahaemolyticus* también fueron investigados por separado por los modelos de regresión logística. Una vez que las variables significativas se seleccionaron a nivel individual, se llevó a cabo un modelo de regresión logística múltiple. La probabilidad estimada y el ratio Odds (OR) fueron estimadas por análisis de regresión logística. El ratio Odds (OR) se define como la previsión del cambio de probabilidades para un aumento de una unidad de la correspondiente variable independiente.

El recuento de *V. parahaemolyticus* fue transformado en log en base₁₀ para los análisis estadísticos y todos estos análisis se llevaron a cabo con SPSS versión 14.0.1 (SPSS Inc.) y el nivel de significación de $P < 0,05$.

4.4. RESULTADOS

4.4.1. *V. parahaemolyticus* en zooplancton, mejillón y agua

V. parahaemolyticus fue detectado en 101 de 226 (44,7%) muestras analizadas durante el estudio. La mayor prevalencia de esta bacteria fue detectada en el zooplancton con 56 muestras positivas de 70 muestras (80%) utilizando PCR directa. No se observaron diferencias significativas en la presencia de *V. parahaemolyticus* entre los dos sitios investigados, aunque la incidencia de esta bacteria fue más alta en las áreas más interiores (punto15) que en zonas más externas de la ría (punto 1) (Tabla 12). La abundancia de *V. parahaemolyticus* en el zooplancton varió entre niveles indetectables (<3 NMP g^{-1}) hasta un máximo de > 110 NMP g^{-1} . Los niveles más altos de *V. parahaemolyticus* se detectaron durante los meses de verano y de otoño de los dos años, mientras que sólo se registraron valores mínimos o indetectables en los meses de invierno (Fig 12). La abundancia prevista de *V. parahaemolyticus* alcanzó su valor máximo en el inicio del estudio en Junio de 2005 y fue disminuyendo hasta obtener los niveles más bajos desde Diciembre 2005 a Febrero de 2006. En 2006, se observó una tendencia de retraso en la abundancia de *V. parahaemolyticus*.

La incidencia de *V. parahaemolyticus* fue inferior en el mejillón (64.6%), aunque la dinámica estacional de esta bacteria fue similar a la del zooplancton (Tabla 12). La máxima abundancia en los meses de verano en ambos años con una densidad media de 54.613 NMP/ g^{-1} en 2005 y 28.806 NMP/g en 2006. Al igual que en el zooplancton, la ausencia o la baja densidad de *V. parahaemolyticus* se vio reflejada en los meses de invierno. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre las muestras de mejillón recogidas a diferentes profundidades, y se observaron incidencias similares en las tres alturas (Tabla 12). Por otra parte, la presencia de *V. parahaemolyticus* en el agua de mar, sólo fue detectada en 14 de 108 muestras (12%), y en su mayoría han estado distribuidas igualmente en los meses de verano de ambos años y en primavera de 2006.

	No.de muestras	No. de muestras positivas (%)		
		Total	<i>trh-positivo</i>	<i>tdh-positivo</i>
Muestras:				
Mejillón	48	31 (64.6)	4 (8.3)	3 (6.3)
Agua	108	14 (12)	3 (2.8)	0 (0)
Zooplankton	70	56 (80)	22 (31)	10 (14)
Total	226	101 (44.7)	29 (12.8)	13 (5.7)
Punto :				
Punto 1	90	30 (33.3)	11 (12.2)	8 (8.8)
Punto 15	136	71 (52.2)	18 (13.2)	5 (3.7)
Total	226	101 (44.7)	29 (12.8)	13 (5.7)
Profundidad:				
0m	52	15 (28.8)	3 (5.8)	1(1.9)
5m	52	16 (30.8)	1(1.9)	1(1.9)
10m	52	14 (26.9)	3 (5.8)	1(1.9)
Total	156	45 (28.8)	7 (4.5)	3(1.9)

Tabla 12. Incidencia (%) de *V. parahaemolyticus* total y patógeno observado en diferentes sitios de muestreo, en diferentes profundidades y en diferentes matrices.

4.4.2. Influencia de los factores ambientales sobre la presencia de *V. parahaemolyticus*

Durante el periodo de estudio, se analizaron los factores ambientales como temperatura atmosférica, temperatura del agua de mar, salinidad y upwelling para observar la asociación de estas variables con la presencia de *V. parahaemolyticus* en zooplankton, mejillón y agua de mar (Fig 12). Las condiciones ambientales fueron muy similares en los dos sitios de muestreo (punto 1 y punto 15) y no se encontraron diferencias significativas entre los dos sitios en relación a las variables oceanográficas investigadas.

La salinidad mostró un pequeño rango de variación con valores que fluctuaron desde 35 hasta 36 ppt, con la excepción del mes de Septiembre del 2006, donde los valores de salinidad fueron disminuyendo hasta alcanzar en Diciembre el mínimo registrado (32 ppt). La temperatura del agua osciló entre 10,5° a 18.5 °C y presentó un patrón estacional inespecífico con subidas y bajadas de temperatura durante todo el estudio. Los índices de afloramientos (upwelling) registrados en estas áreas, aumentaron en los meses de verano y otoño, aunque los niveles más altos se observaron en Diciembre de 2005.

Teniendo en cuenta el modelo de regresión de logística simple, no se observó ninguna asociación significativa entre la abundancia de *V. parahaemolyticus* en las muestras analizadas y sus factores ambientales en aguas oceánicas, a excepción del upwelling ($P < 0.01$), que mostró significativamente un efecto negativo en presencia de *V. parahaemolyticus* y fue considerada como la principal variable que rige la dinámica de esta bacteria en esta zona.

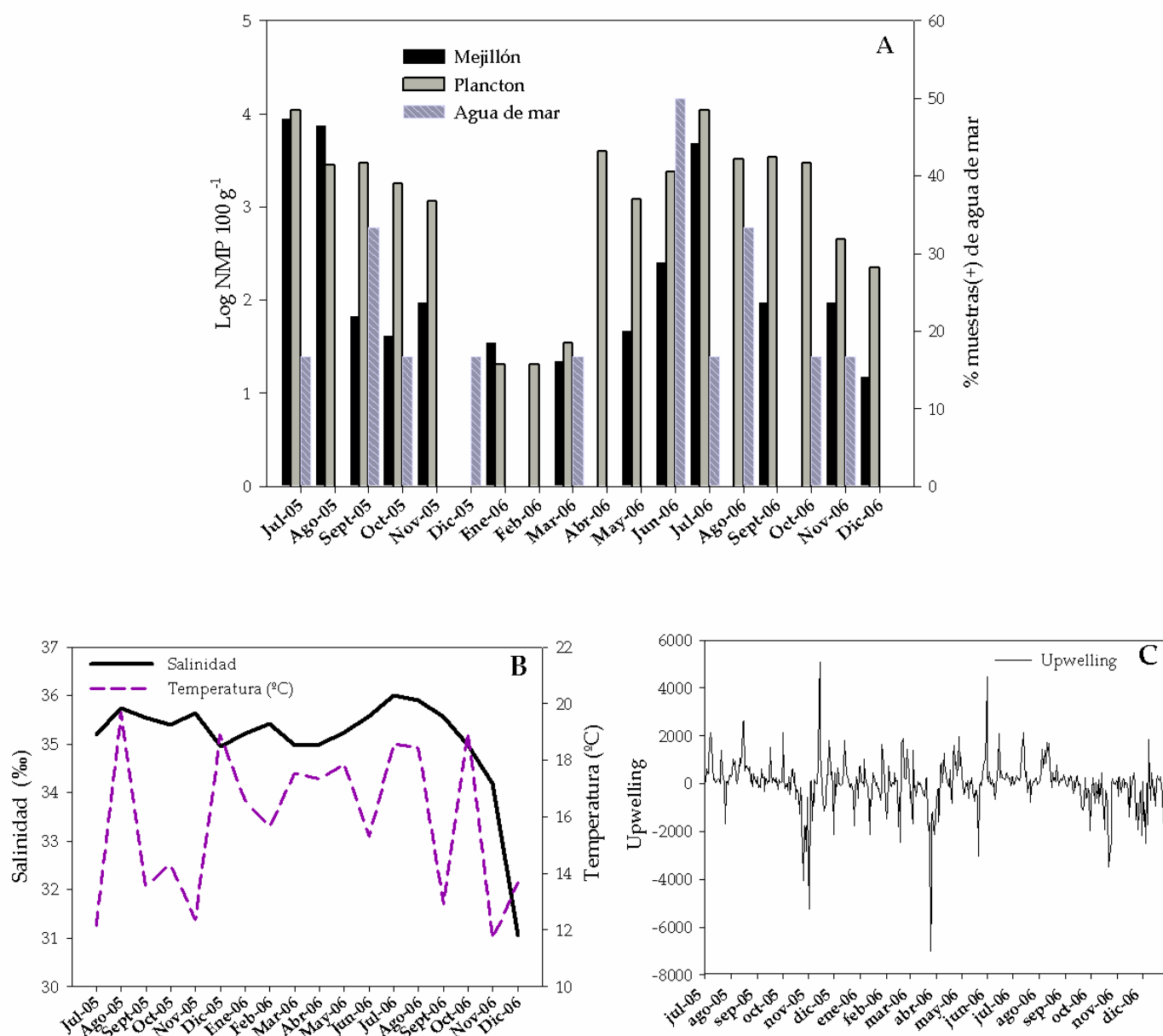


FIG 12. Distribución de *V. parahaemolyticus* en zooplancton, mejillón y agua de mar durante el periodo del estudio (A) y las variaciones de la salinidad, temperatura (B) y upwelling registradas durante el mismo período (C).

4.4.3. Presencia de genes de virulencia

El gen *trh* fue identificado principalmente en las muestras de zooplancton en 22 (31%) de 70 muestras analizadas. Sin embargo la incidencia de este gen en muestras de mejillón y agua fue menor, con un 8.3% y 2.8% respectivamente (Tabla 12). Los resultados demuestran una alta incidencia de las poblaciones de *V. parahaemolyticus trh+* en zooplancton durante los meses de verano y otoño, con cuatro meses de máxima abundancia: agosto y octubre de 2005 con valores de > 110 y 24 NMP g^{-1} , respectivamente, y en abril y en octubre del 2006, ambos meses con recuentos de 46 NMP g^{-1} (Fig 13). La abundancia de las poblaciones de *V. parahaemolyticus trh+* en mejillón sólo fue detectada en los meses de Octubre de 2005 y Diciembre de 2006, con valores muy bajos en los dos meses. Por otra parte, la prevalencia de *V. parahaemolyticus trh+* en muestras de agua se detectó exclusivamente en el año 2006, en tres muestras positivas en Marzo, Junio y Octubre del 2006 (Fig. 13). La abundancia de *V. parahaemolyticus trh+* en cualquier tipo de muestras no estuvo influenciada por ninguno de los parámetros de temperatura, salinidad y upwelling. No obstante, sí se observó una relación con la abundancia total de zooplancton ($P < 0.05$) y una fuerte asociación entre la presencia del gen *trh* en zooplancton y la abundancia total de *V. parahaemolyticus* ($P < 0.01$).

Por el contrario, la incidencia del gen *tdh+* fue detectada en 13 (5.7%) de las 226 muestras totales analizadas (Tabla 12). Las poblaciones de *V. parahaemolyticus tdh+* también fueron mayoritariamente identificadas en muestras de zooplancton, detectándose en 10 muestras (14%). La densidad de *V. parahaemolyticus* fue extremadamente baja durante Julio de 2005 y Mayo, Julio y Noviembre de 2006, pero una muestra recogida en Agosto de 2005, representó el valor más alto, $> 110 \text{ NMP g}^{-1}$. No se encontraron poblaciones de *V. parahaemolyticus tdh+* en las muestras de aguas recogidas durante el estudio. La presencia del gen *tdh* en el mejillón fue positiva en 3 muestras, detectadas en Agosto 2005, Octubre y Diciembre del 2006 con densidades de 74 NMP g^{-1} en los tres meses. Tampoco se encontró ninguna asociación significativa entre los factores ambientales y las poblaciones de *V. parahaemolyticus tdh+* procedentes de diferentes orígenes.

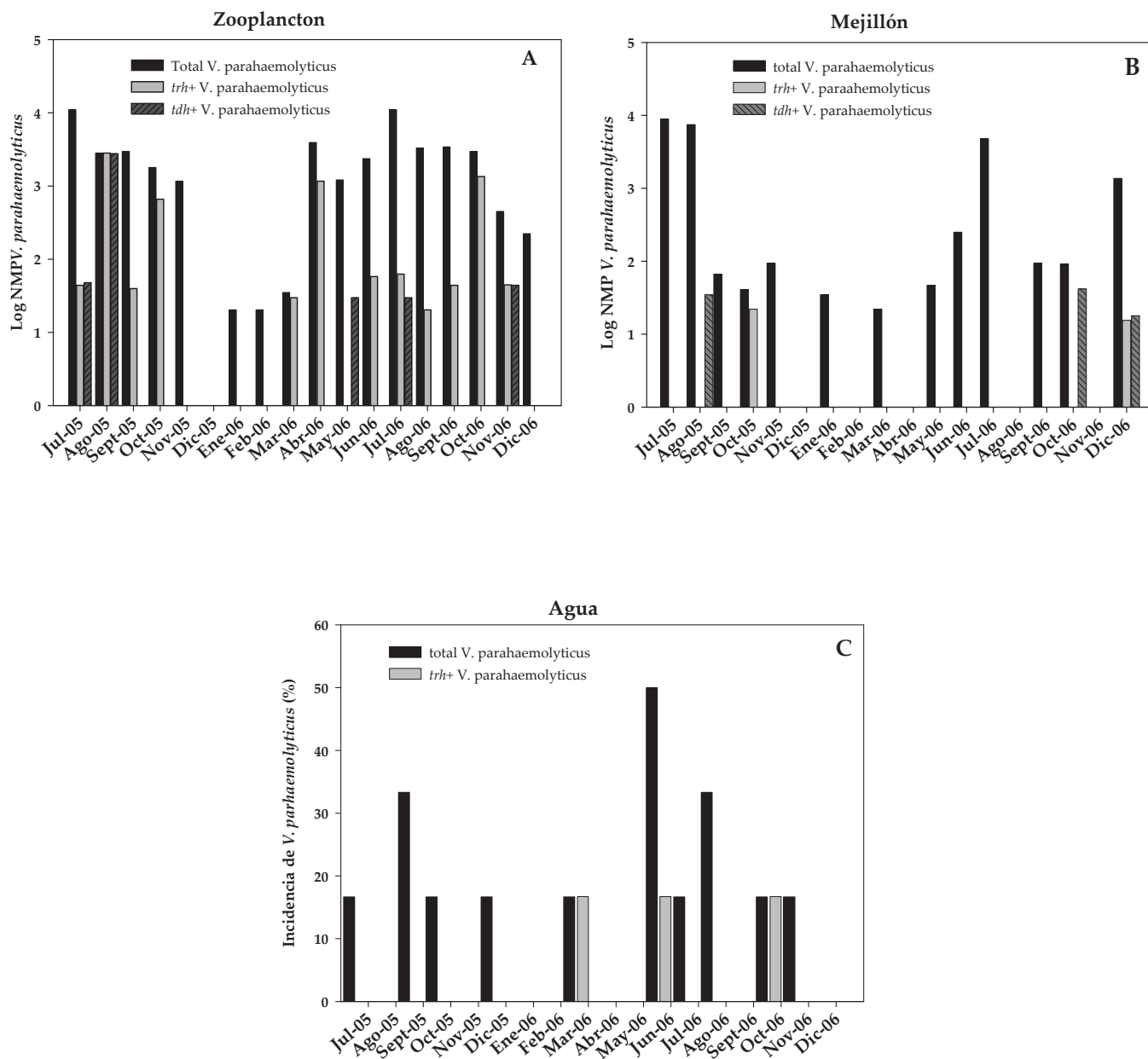


FIG 13. Abundancia de las poblaciones de *V. parahaemolyticus* total, *tdh+*, *trh+* en zooplankton (A), mejillón (B) y agua (C).

4.4.4. Caracterización de cepas aisladas

Un total de 1266 colonias de zooplancton y 143 de agua de mar fueron seleccionadas de las placas de TCBS y CHROMagar. De estas colonias, 267 de zooplancton y 21 de aguas fueron confirmadas como *V. parahaemolyticus* por PCR. La investigación de los marcadores de genes patógenos, permitió la identificación de 41 cepas *trh+/tdh-* en zooplancton y únicamente un aislamiento con este genotipo en agua de mar. Estas cepas fueron aisladas durante todos los meses excepto Noviembre y Diciembre de 2005 y Enero, Febrero, Mayo de 2006. La abundancia media relativa de las cepas *trh+/tdh-* en zooplancton fue del 15.3%. No se identificaron cepas *tdh+* en ninguna de las muestras.

El perfil genético de las cepas *trh+* fue utilizado para evaluar el grado de similitud entre cepas aisladas en diferentes épocas y hábitats (Fig 14). El análisis de PFGE de las 42 cepas *trh+*, reveló la presencia de 9 importantes clusters genéticos. Más del 90% de las cepas fueron asignados a 4 grupos principales. Los dos clusters más grandes (2 y 3 en la Fig 14), ambos con 13 cepas, agruparon cepas con serotipos O10:K71 (grupo2) y serotipos OUT:KUT (grupo3). Las cepas pertenecientes al cluster 1 y 5, compartieron serotipo O1:K56, pero mostraron perfiles genéticos diferentes en el análisis de PFGE. Tres de los clusters genéticos presentaron una clara estacionalidad: el cluster 1 se detectó exclusivamente en verano del 2005, el cluster 3 en otoño del 2006, y el cluster 4 en primavera y verano del 2006. El cluster 2 fue el único grupo detectado en los dos años, en otoño de 2005 y en verano de 2006. Las cepas *trh+* de zonas oceánicas fueron comparadas con un grupo representativo de cepas *trh+* que presentan diferentes variantes genéticas y fueron aisladas en los últimos 6 años de zonas estuáricas dispersas a lo largo de más de 1500 Km de costa (Fig 14). Los resultados procedentes del análisis comparativo demostraron la existencia de clusters genéticos que incluyen cepas exclusivamente de zonas oceánicas (grupos 1 y 3) y otros clusters que incluyen cepas tanto de ambientes estuáricos como oceánicos, las cuales comparten perfiles genéticos indistinguibles (grupo 2,4 y 5).



FIG 14. Dendrograma circular generado por el software Bionumerics y representado con el software iTOL, mostrando las relaciones genéticas entre las 42 cepas *trh+/tdh-* de *V. parahaemolyticus* aisladas de zonas oceánicas en el presente estudio y 24 cepas obtenidas de las zonas de estuarios a lo largo de 1500 km de la costa de Galicia. De interior a exterior, los diferentes anillos indican la zona de origen (oceánicas o estuáricas), la temporada de aislamiento, respectivamente para cada cepa, y los números en el dendrograma representan el porcentaje de similitud entre los diferentes grupos.

4.4.5. Asociación con el zooplancton

La fracción de plancton > 200 micras se compone principalmente de copépodos, los cuales representaron el 52,2 % (abundancia media relativa) del zooplancton total (Tabla 13). El número de especies de los diferentes copépodos identificados en el estudio fue de 33, con un número variable de especies por muestra en un rango de 9 a 23. La mayor diversidad de copépodos fue característicamente observada durante los meses de menos abundancia (otoño e invierno) (Fig 16). La especie más dominante fue la *Acartia clausi*, que representa la mitad de todos los copépodos, seguida por *Temora longicornis* (8%), *Calanus helgolandicus* (6%) y *Paracalanus parvus* (5%). Otros grupos más abundantes en el zooplancton, además de los copépodos, fueron Cladocera (12%), larvas de equinodermos (8%), Appendicularia (8%) y larvas Cirrípeda (7%).

Grupos	Abundancia relativa (Promedio %)	Clase o Orden	Abundancia relativa (Promedio %)
Radiolaria	0.96	Lamelibranchia larvae	2.00
Acartaria	0.01	Cirripeda larvae	6.83
Foraminifera	0.36	Cirripeda cypris	0.33
Tintinnidae	0.28	zoea <i>Pisidia longicornis</i>	0.24
Cnidaria	2.16	Decapoda larvae	0.14
Nauplius cladocera	0.27	Braquiura zoea	0.17
Cladocera	12.10	Braquiura megalopa	0.03
Isopoda	0.01	Euphasiaceae larvae	0.06
Ostracoda	0.01	Echinodermata larvae	8.11
Eufasiaceos	0.01	Polychaeta larvae	0.33
Chaetognata	1.66	<i>Sardina pilchardus</i> eggs	0.03
Appendicularia	7.84	Fishes larvae	0.01
Doliolila	0.01	<i>Sardina pilchardus</i> larvae	0.02
Siphonophora	1.62	Phoronida larvae	0.01
Briozoa larvae	0.33	Copepoda:	52.28
Gastropoda larvae	1.75		

Tabla 13. Composición del zooplancton y la abundancia media relativa de los diferentes grupos identificados en todas las muestras recogidas a lo largo del estudio.

La dinámica estacional del zooplancton total ofreció un patrón similar al que observamos en la abundancia de *V. parahaemolyticus*. La abundancia total de zooplancton fue elevada al inicio del estudio, en los meses de verano y comenzó a disminuir durante los meses de otoño e invierno (Fig 15). Sin embargo, los valores máximos de zooplancton fueron detectados en Abril de 2006, alcanzando densidades de 35860 ind/m³ y en los meses de verano con una abundancia media de 26096 ind/m³. Esta tendencia estacional fue similar para todos los grupos de zooplancton analizados.

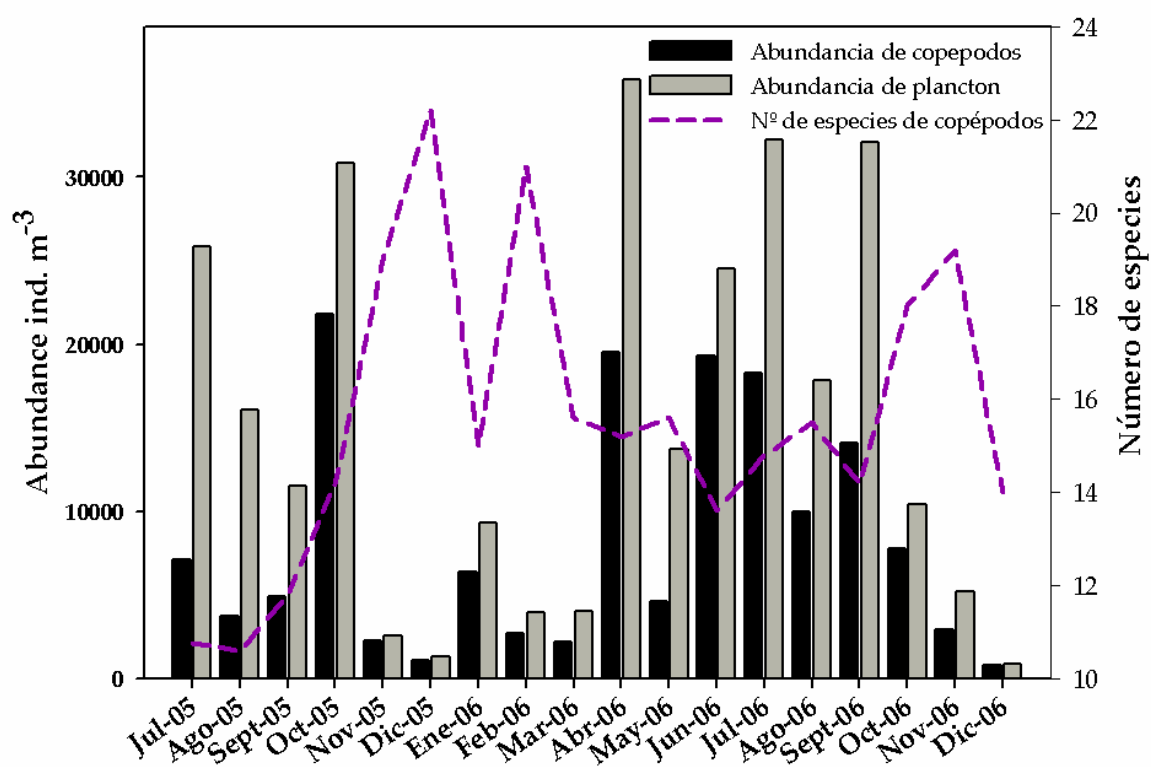


FIG 15. Abundancia del zooplancton total, copépodos y el número de especies registradas en el periodo del estudio.

La asociación de las variables ambientales (temperatura ambiental, temperatura oceanográfica, salinidad y upwelling) con la abundancia de zooplancton también fue analizada estadísticamente. La temperatura del agua no tuvo ninguna influencia significativa en la abundancia de zooplancton, aunque la salinidad y el upwelling mostraron un efecto significativo positivo y negativo ($P < 0,01$) respectivamente, en el número total de individuos. Adicionalmente, la abundancia de zooplancton estuvo fuertemente asociada con la abundancia de *V. parahaemolyticus* ($P < 0.001$).

4.5. DISCUSIÓN

El ciclo de vida de *V. parahaemolyticus* ha sido tradicionalmente atribuido a las zonas de estuarios donde los niveles moderados de salinidad, temperaturas moderadas y la disponibilidad de nutrientes proporcionan las condiciones adecuadas para la supervivencia de muchas especies de *Vibrio* (Joseph et al., 1982). Por el contrario, la presencia de *V. parahaemolyticus* ha sido considerada extremadamente limitada en aguas oceánicas debido a la influencia de las condiciones adversas prevalentes durante todo el año (Joseph et al., 1982). Los resultados del presente estudio han demostrado que las zonas oceánicas pueden ser el hábitat común de *V. parahaemolyticus*, ya que este organismo sobrevive casi exclusivamente en estrecha asociación con el zooplancton.

V. parahaemolyticus fue detectado en el 80% de las muestras de zooplancton en áreas oceánicas durante todo el estudio con la única excepción de Diciembre de 2005. En mejillón, también estuvo en el 64.6 % de las muestras. Esta alta incidencia encontrada en aguas oceánicas contrasta notablemente con los datos de esta bacteria en zonas interiores de las rías de Galicia, donde la presencia de *V. parahaemolyticus* fue de un 12,5 % en moluscos (Martinez-Urtaza et al., 2008b). Sin embargo, la prevalencia de *V. parahaemolyticus* en muestras de aguas procedentes de zonas oceánicas fue menor (12%) en comparación a la incidencia detectada en zonas internas de las rías (35,3 %) (Capítulo 1). A diferencia de los estuarios, las condiciones de temperatura y salinidad no tuvieron ningún efecto sobre la prevalencia y estacionalidad de *V. parahaemolyticus* en zonas oceánicas. La única variable que resultó tener una influencia evidente sobre el *V. parahaemolyticus* fue la producción primaria, medida a través del índice de upwelling.

Las rías están expuestas a secuencias estacionales de upwelling-downwelling que determinan los patrones de la circulación y el intercambio de agua en las zonas interiores de las rías (Álvarez-Salgado et al., 2000). La entrada de aguas centrales del Atlántico Norte Oriental, frías y ricas en nutrientes, hacia las zonas estuáricas, promueven los eventos de upwelling, mejorando la producción primaria y la posterior producción local de zooplancton. La presencia de *V. parahaemolyticus* ha sido asociada con la producción primaria en estuarios y en áreas de salinidad moderada en diferentes regiones del mundo, como Alemania (Oberbeckmann et al., 2011), el Golfo de México (Johnson et al., 2010) y Francia (Julie et al., 2010). Sin embargo, la presencia de *V. parahaemolyticus* en aguas oceánicas estuvo favorecida por la reducción de la producción primaria o

también denominado downwelling, produciendo un aumento en la abundancia de zooplancton. Concretamente, fue la estacionalidad específica de los eventos de downwelling, la que correlacionó con la dinámica de *V. parahaemolyticus*. Durante los períodos de downwelling, las aguas subtropicales cálidas y salinas se mueven hacia los polos desde el Sur de Portugal hasta la plataforma Armorica en Francia (Álvarez-Salgado et al., 2000). La llegada de estos eventos de downwelling en Galicia, permiten que las aguas oceánicas entren en el interior de las rías (Álvarez-Salgado et al., 2000; Crespo et al., 2006). Este desplazamiento hacia el interior de las rías durante estos periodos de downwelling puede representar una fuente importante de zooplancton oceánico y paralelamente una fuente de poblaciones de *V. parahaemolyticus* que se adhieren a ellos. Casualmente, uno de los mayores brotes de *V. parahaemolyticus* detectados en Europa, tuvo lugar en Galicia en 1999 (Lozano-León et al., 2003) y coincidió con la incursión de aguas cálidas tropicales en las rías y la presencia de grandes nichos de zooplancton (Baker-Austin et al., 2010). Similares condiciones oceanográficas fueron relacionadas con importantes brotes de *V. parahaemolyticus* en otras regiones del mundo, como Perú (Martínez-Urtaza et al., 2008), Alaska (Martínez-Urtaza et al., 2010) y Chile (Ansede-Bermejo et al., 2010). De la misma manera, las aguas templadas de la corriente del Golfo se han propuesto como el vehículo de cepas subtropicales de *Vibrio* en la bahía de Barnegat en los EE.UU. (Thompson et al., 2004b).

El incremento de la temperatura, podría haber causado una mayor abundancia de *V. parahaemolyticus*, ya que en condiciones más cálidas, se espera que aumente la proliferación de células de *V. parahaemolyticus* en el exoesqueleto del zooplancton (Kaneko and Colwell, 1973; Kaneko and Colwell, 1975; Kaneko and Colwell, 1978; Baffone et al., 2006). Sin embargo, no se observó que el aumento de la densidad de *V. parahaemolyticus* y zooplancton estuviera influenciado por la temperatura del agua. Otra posible explicación para el incremento de las densidades de *V. parahaemolyticus* en zooplancton podría ser una influencia distintiva de los diferentes grupos que constituyen el zooplancton. Los cambios temporales en la composición del zooplancton y la dominancia de las especies puede favorecer la abundancia de grupos que llevan cargas más grandes de *V. parahaemolyticus*.

A pesar de lo poco frecuente que es la detección de cepas de *V. parahaemolyticus* patógenas en el medio ambiente, los resultados de este estudio han puesto de manifiesto que la presencia de cepas potencialmente patógenas no es tan extraña en el zooplancton oceánico y representan una fracción relevante del microbioma del mesozooplancton. Aunque el zooplancton ha sido propuesto como vehículo para el desplazamiento del cólera (Lipp et al., 2002) y *V. parahaemolyticus* patógeno (Martinez-Urtaza et al., 2008; Martinez-Urtaza et al., 2010), los resultados de este estudio representa una de las primeras evidencias empíricas de que las poblaciones virulentas pueden sobrevivir en condiciones oceánicas. El análisis de la estructura poblacional de la cepas *trh+* utilizadas en el rastreo de la dispersión de las poblaciones de *Vibrio*, también ha revelado un patrón estacional específico con poblaciones distintivas que prevalecen en diferentes periodos del año, lo que puede sugerir que la presencia de estas poblaciones esté relacionada con los cambios de la composición del zooplancton. Comunidades diferenciadas de *Vibrio* aisladas de aguas frías y calientes del océano han sido detectadas en la costa del Norte del Atlántico en EEUU (Thompson et al., 2004b). Al mismo tiempo, fue detectado un perfil común entre algunos grupos de cepas procedentes de estuarios y de aguas oceánicas. Cepas genéticamente idénticas fueron detectadas en el zooplancton de aguas oceánicas del Sur de Galicia en estuarios de las zonas más internas de las rías. Estas localidades se encuentran dispersas a lo largo de más de 1500 km de la costa Oeste y el Norte de la Península Ibérica. De acuerdo con estos resultados, es razonable postular la existencia de mecanismos de dispersión de *V. parahaemolyticus* en esta área, mediada por la migración de zooplancton en las corrientes marinas. La llegada del zooplancton y el reclutamiento continuo de nuevas comunidades de *V. parahaemolyticus* hacia las zonas estuáricas, pudiera estimular un proceso frecuente de mezcla de poblaciones a escala local con el consecuente impacto en la demografía de la población. La ausencia de barreras de dispersión (Oakley et al., 2010; Preheim et al., 2011), junto con las altas tasas de recombinación de *Vibrio* (Vos and Didelot, 2008), pueden constituir las principales causas que determinen la diversidad genética de las poblaciones de *Vibrio* encontrada en microbiomas marinos (Hoffmann et al., 2010; Preheim et al., 2011).

En conclusión, la supervivencia de *V. parahaemolyticus* en estos ecosistemas naturales es casi exclusivamente dependiente de la distribución y fenología de zooplancton que, además, controlan la dinámica estacional y poblacional de *V. parahaemolyticus*. De acuerdo con estos resultados, el zooplancton debería proporcionar un único entorno de protección para la supervivencia de *V. parahaemolyticus* bajo las condiciones físico-químicas y nutricionales adversas de las áreas oceánicas, así como una plataforma estable para las migraciones de larga distancia. Además, estos resultados abren la posibilidad de que, en ausencia de barreras geográficas, *Vibrio* podría ocupar libremente áreas y hábitats extensos, conectando diferentes poblaciones, con su correspondiente impacto en la demografía de las comunidades locales y en la epidemiología de las enfermedades causadas por estos organismos.

CAPÍTULO 3

-Dinámica estacional de la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* y *V. cholerae* en zonas de producción de cultivo de Galicia-

5. Dinámica estacional de la presencia de *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* en zonas de producción de cultivo de Galicia

5.1. RESUMEN

V. cholerae y *V. parahaemolyticus* son importantes patógenos humanos del género *Vibrio* que se transmite por el consumo de moluscos contaminados. El consumo de ostras ha sido considerado como el vehículo principal de infección en Galicia. A pesar de la importancia que tiene el cultivo de moluscos en esta comunidad gallega, poco se conoce acerca de la presencia de *Vibrio* patógenos en el marisco. En este estudio, se evaluó la presencia de estas dos especies de *Vibrio* en 77 muestras de ostras recolectadas en la Ría de Arousa, de Febrero a Diciembre de 2007. *V. parahaemolyticus* fue detectado en un 44.2% de las muestras analizadas por PCR directa. La mayor incidencia de *V. parahaemolyticus* fue observada en los meses de verano (78.9%), coincidiendo con los máximos niveles de *V. parahaemolyticus*, alcanzando en Agosto densidades de 2747,2 NMP/100g. Las poblaciones patógenas de *V. parahaemolyticus* *trh*⁺ (3.9%) y *tdh*⁺ (5.2 %) en las muestras de ostras han sido limitada durante el periodo del estudio, aunque han sido detectados valores altos de abundancia en Agosto con densidades de 781,7 y 1929,7 MNP/100g, respectivamente. Una diferente dinámica estacional fue observada en *V. cholerae*. La presencia de *V. cholerae* se detectó en 20 (25.9%) de 70 muestras analizadas con una mayor incidencia (48.1%) y abundancia (324.5 MNP/100g) en primavera. No se detectó *V. cholerae* de Julio a Diciembre, a excepción de una muestra recogida en Noviembre. Parámetros ambientales como la temperatura del agua de mar y fitoplancton presentaron asociaciones significativas con la presencia de *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* respectivamente. Esto podría sugerir que estas variables podrían considerarse como los principales factores que gobiernan la dinámica poblacional de estas bacterias.

5.2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituyen, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. La mayoría de estas enfermedades son de origen microbiano y los alimentos y el agua contaminada se consideran una fuente importante de contagio (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1996; Adams and Moss, 1997). Se ha demostrado que el consumo de productos marinos contaminados puede provocar un cierto número de enfermedades en el hombre. Estas enfermedades son muy diversas, encontrándose entre las principales: la fiebre tifoidea y paratifoidea, salmonelosis, infección por *V. parahaemolyticus*, hepatitis vírica de tipo A, intoxicación paralizante por moluscos y cólera (Organización Mundial de la Salud, 1974).

Los bivalvos están considerados como agentes de alto riesgo de contagio por ser organismos asociados a la transmisión de enfermedades debido a su peculiar procedimiento de alimentación. Estos organismos filtran agua, reteniendo y acumulando microorganismos y otras sustancias. Las bacterias enteropatógenas pueden estar presentes en los tejidos de los bivalvos en concentraciones mayores que en el agua y, dado que las ostras por lo general se ingieren crudas, pueden presentar un problema importante para la salud de los consumidores, ya que estarían altamente relacionadas con trastornos gastrointestinales. Las ostras son uno de los bivalvos marinos más contaminantes, ya que debido a su condición de organismos filtradores, a través del bombeo del agua, son capaces de acumular gran cantidad de partículas en suspensión y por tanto microorganismos patógenos del medio ambiente (Lee and Morgan, 2003). Su flora bacteriana guarda relación con la calidad de las aguas donde se encuentran, por lo que son considerados vehículos en la transmisión de toxiinfecciones alimentarias (Martínez and Villalobos, 2005)

Por lo tanto, la ingestión de mariscos ha sido reconocida como una de las causas de los brotes de infecciones bacterianas y virales (Ingresoll, 1881). Uno de los primeros brotes registrados asociados con el consumo de ostras crudas fue descrito en 1816 por el médico francés Pasquier APP (Pasquier, 1818), causando la fiebre tifoidea en un grupo de personas que consumieron ostras contaminadas por aguas residuales. Desde finales del siglo XIX, más de 400 brotes y 14.000 casos de infección han sido publicados en Estados Unidos

(Rippey, 1994). Mientras que los datos sobre la mayoría de los brotes que ocurren en los EE.UU. continuamente son publicados en la web del CDC, el panorama mundial de los brotes de infección asociados a mariscos en Europa, Asia y Australia también han sido divulgados en menor medida.

Además de *Salmonella spp.*, existen otros agentes bacterianos importantes implicados en enfermedades por el consumo de marisco crudo. Los ejemplos más notables incluyen especies de *Vibrio*, que representan el 20% de todos los brotes de la enfermedad (Potasman et al., 2002). La concentración de vibriones depende de las condiciones hidrográficas y geográficas. En organismos filtradores, los factores determinantes son el tipo de especie, la ubicación en la columna de agua y el tiempo de permanencia en la misma (Lee and Younger, 2002). Los vibrios son parte de la microbiota natural de ambientes marinos y estuáricos y algunos pueden causar infecciones en los seres humanos que hayan sido expuestos a mariscos o agua de mar contaminados. Sin embargo, los microorganismos comúnmente empleados para indicar la contaminación no dan indicios de la presencia de estas bacterias autóctonas. *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* son bacterias patógenas en humanos, se encuentran en el medio marino y pueden causar enfermedades gastrointestinales, ya sea en casos aislados o en forma de brote (DePaola and Hwang, 1995; Tamplin, 2001). Un brote se define como la aparición repentina de una enfermedad debida a una infección en un lugar específico. El término "casos esporádicos" describe un patrón irregular de incidencia, con casos aislados que suceden en intervalos irregulares. Los casos esporádicos pueden ser anotados como "casos clínicos" que presentan la información pertinente sobre los casos individuales.

Tanto en países asiáticos como en EE.UU., *V. parahaemolyticus* es una de las principales causa de infecciones intestinales transmitidas por alimentos, casi siempre asociada con el consumo de pescado o mariscos crudos como la ostra. Sin embargo, en Europa, el riesgo de infecciones por *V. parahaemolyticus* ha sido considerado muy bajo (Lozano-León et al., 2003), y ha estado limitado mayormente al consumo de productos asiáticos o a personas que habían visitado esa zona. Sin embargo, durante los últimos años, se ha producido un incremento en el número de casos asociados directamente con productos de mar europeos como en Francia y España. Este aumento podría estar relacionado con el aumento del comercio de productos de la pesca a nivel mundial y la entrada de clones patógenos de otras regiones geográficas. Hasta los años 90,

los dos brotes de infección más importantes se produjeron en Francia, relacionados con el consumo de marisco (gambas) importado de Asia resultando afectadas 44 personas (Lemoine et al., 1999; Robert-Pillot et al., 2004), y en España, donde se detectó un brote de infección vinculado con el consumo de pescado y marisco que causó ocho casos de gastroenteritis por *V. parahaemolyticus* en Barcelona en 1989 (Molero et al., 1989).

El brote de infección más importante en el continente europeo se produjo en Galicia en 1999 y no fue debido al consumo de productos importados (Lozano-León et al., 2003). Un total de 64 casos de infección fueron identificados en episodios de gastroenteritis asociadas al consumo de ostra viva procedente de Galicia, donde nueve pacientes fueron hospitalizados y el análisis de las muestras de heces reveló la presencia de *V. parahaemolyticus*. En Julio de 2004, se produjo una significativa novedad en relación con la epidemiología de *V. parahaemolyticus* en Europa. La presencia del clon pandémico del serotipo O3:K6 de *V. parahaemolyticus* fue detectada por primera vez en el continente europeo en un brote de infección en A Coruña resultando afectadas 80 personas. Las investigaciones epidemiológicas realizadas han identificado el buey de mar como el vehículo más probable de infección.

Se ha sugerido que este bajo número de casos registrados de infección por *V. parahaemolyticus* en España y el resto de Europa pueda estar más relacionado con deficiencias en la investigación de este patógeno en los laboratorios clínicos, más que con la baja incidencia real de este microorganismo (Martinez-Urtaza et al., 2004). Esta bacteria no está incluida en la red de vigilancia epidemiológica y de control de enfermedades transmisibles en la Comunidad Europea y tampoco en el sistema de vigilancia microbiológica de infecciones asociadas a gastroenteritis (Anonymous, 2001). Por esta razón, este patógeno no es investigado de forma rutinaria en todos los casos clínicos asociados a enfermedades transmitidas por los alimentos, limitándose esta vigilancia a hospitales especializados y ubicados en zonas costeras con una tradición de consumo de moluscos durante los meses de verano. Cuando se detecta *V. parahaemolyticus*, la investigación es normalmente restringida a la identificación del agente etiológico, sin el control de la fuente de infección, el alimento implicado o el número y la virulencia de las cepas aisladas. Esta falta de información limita la importancia de los estudios epidemiológicos sobre las infecciones de gastroenteritis y la fuente de alimento, lo cual no podría estimar

el riesgo real de *V. parahaemolyticus* asociado con el consumo de mariscos y una efectiva evaluación del riesgo.

En los últimos años, no se conoce con exactitud la distribución espacial y temporal de los brotes de cólera en Europa, aunque existan casos esporádicos en este continente. El *Vibrio cholerae* llegó a Europa entre 1817 y 1823 procedente de la India, difundiéndose en diversas zonas del continente (S-Granjel Santander and Granjel, 1980). Su posterior propagación a lo largo de sucesivos países de Europa hace aparecer, finalmente, los primeros casos en España. Las epidemias en España fueron una serie de brotes de cólera que ocurrieron desde el primer tercio del siglo XIX hasta finales del mismo siglo en grandes ciudades de España (S-Granjel Santander and Granjel, 1980). El primer brote ocurrió a principios del año 1833 en el puerto de Vigo y se propagó a Pontevedra, quedando aislado en esa área de Galicia. Simultáneamente otros brotes de cólera tuvieron lugar en Extremadura y Andalucía, extendiéndose posteriormente al resto del país (Schreiber and Mathys, 1987).

En 1852 se inició otra gran epidemia de cólera en Indonesia llegando a Europa de forma generalizada durante los años 1854-55, manifestándose de forma más severa, siendo conocidos estos años como “los años del cólera”. Se extendió en la península a través de Valencia, donde se dieron los primeros casos. Hubo unos 800.000 afectados y más de 200.000 muertes. Sin embargo se logró un importante avance, ya que el científico británico John Snow demostró en un estudio epidemiológico exhaustivo que la patología la causaba un microorganismo que se propagaba a través del consumo de agua contaminada por materias fecales. Poco a poco las medidas de saneamiento realizadas a nivel Europeo lograrían ir frenando lentamente la pandemia. En el siglo XX sólo hubo dos brotes de cólera en España que sucedieron en 1971 y 1979, y fue controlado con relativa facilidad siendo escaso el número de infectados en comparación con los brotes del siglo XIX.

Actualmente, no existen brotes ni casos de infección de *V. cholerae* asociados al consumo de mariscos en España, aunque se haya observado que durante el 2011 se han publicado casos de cólera por *V. cholerae* toxigénico en Asia, Pacífico y Europa del Este, en Afganistán, Irán, India, Pakistán, Malasia, China, Papúa Nueva Guinea, Filipinas, Ucrania y Uzbekistán.

A raíz de los dos importantes brotes europeos detectados en Galicia, la presencia de *Vibrio* spp (*V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*) en moluscos ha sido ampliamente estudiada en estos últimos años. Sin embargo, la información obtenida sobre la incidencia de estos patógenos en ostras ha sido escasa, aunque se considere el principal vehículo de infección en esta zona al ser el molusco de mayor consumo en crudo. Por ello, en este estudio, se ha evaluado la prevalencia y la abundancia de *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* total y patógeno en ostras cultivadas en la Ría de Arousa y su posible relación con los factores ambientales.

5.3. MATERIAL Y MÉTODOS

5.3.1. Área del estudio y colección de muestras

El estudio se llevó a cabo en la ría de Arousa, una de las más importantes rías de Galicia, situada en la costa atlántica al Oeste de España. Es la ría de mayor extensión con sus 230 km², aunque no es la que alcanza mayores cotas batimétricas con sus 69 metros de profundidad máxima. Los ríos que desembocan en ella son el río Ulla en su cabecera y el río Umia en la ensenada que forma la península de El Grove con la costa de Cambados. Su configuración física permite una elevada producción de fitoplancton, con un flujo marino característico, que hace que esta ría sea famosa por su riqueza marina. Esta ría se considera la zona de mayor producción de mejillón de todo el mundo, cultivado en viveros flotantes llamados bateas.

Las muestras de ostras fueron recogidas bimensualmente de Febrero a Diciembre de 2007 en la Ría de Arousa, a excepción de estos dos meses (Febrero y Diciembre) donde su recolección fue mensual. Estas muestras fueron recolectadas en 5 puntos de muestreos (R1, R2, R3, R4 y R5) de las zonas de cultivo de moluscos (Fig 16) y fueron remitidas a los laboratorios del Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela para su posterior análisis. Simultáneamente a la toma de muestras, se registraron valores de salinidad y temperatura del agua en cada punto y los valores de temperatura ambiental, intensidad y dirección del viento, lluvia y horas de sol han sido facilitados por el Ministerio de Medio Ambiente. En alguno de los días de muestreo, no se recogieron las muestras de ostras en los 5 puntos correspondientes.

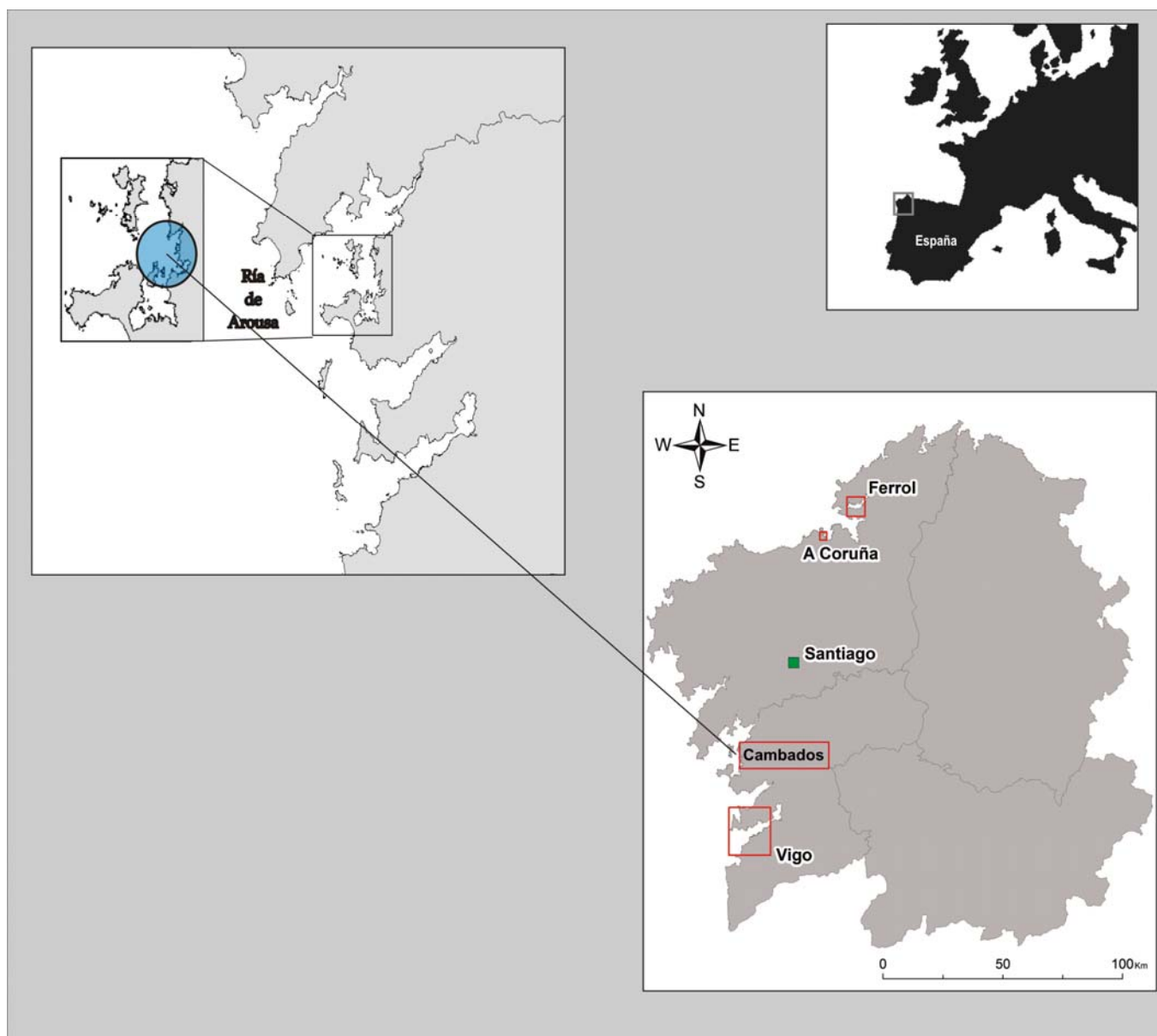


Fig 16 .Ubicación de la zona de muestreo en la Ría de Arousa.

5.3.2. Análisis microbiológico de *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae*

Todas las muestras fueron analizadas por los procedimientos que se basan en las técnicas validadas internacionalmente a las que se les ha incluido una fase final de identificación por PCR. Un total de 77 muestras de ostra investigadas fueron analizadas por el método de Ausencia-Presencia. En paralelo también se realizó la técnica del Número más Probable (NMP) como procedimiento analítico para cuantificar *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae*.

5.3.3. Método de Ausencia-Presencia

Este método cualitativo fue realizado en base al método estándar ISO 8914 (ISO 8914, 1990), modificado de acuerdo con el procedimiento de Hara-Kudo y col. (Hara-Kudo et al., 2001; Hara-Kudo et al., 2003), adaptado por Blanco-Abad y col (Blanco-Abad et al., 2009). Cincuenta gramos de carne de cada muestra de ostras fueron transferidos a bolsas de plástico con 450 ml de agua peptonada alcalina (APW) para *V. parahaemolyticus* y agua peptonada (BPW; Merck, Darmstadt, Germany) (ver anexo, medio 12) para *V. cholerae* obteniendo una dilución 1:10. Cada muestra en APW y BPW fue homogeneizada durante 60 s con un Stomacher e incubadas a 37 °C durante 16-18 h. Un mililitro de las alícuotas de estos caldos de enriquecimiento que presentaron crecimiento fueron analizadas por PCR y adicionalmente fueron sembradas en 2 placas de agar de TCBS (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) y en una placa de CHROMagar Vibrio (CHROMagar Microbiology, París, Francia), y se incubaron durante 16-18 h a 37 °C. Las colonias de *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* fueron seleccionadas y cultivadas en TSA 2% de NaCl (Difco) para *V. parahaemolyticus* y agar nutritivo (NA) (ver anexo, medio 13) para *V. cholerae*. Una vez incubadas estas placas a 37 °C durante 24 h, las colonias fueron confirmadas por PCR.

5.3.4. Método del Número más Probable (NMP)

Como procedimiento analítico para cuantificar *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* se realizó la técnica del Número Más Probable (NMP), siguiendo el procedimiento del BAM (Manual Analítico Bacteriológico) (Elliot et al., 1992), con las modificaciones descritas por Hara-Kudo y col. (Hara-Kudo et al., 2001; Hara-Kudo et al., 2003) adaptado por Blanco-Abad y col (Blanco-Abad et al., 2009). Un total de 10 ml de la dilución 1:10 de APW (que contiene 1 g de la muestra), 1 ml de las diluciones 1:10 y 1:100 fueron inoculadas en los tres tubos de tres series NMP e incubadas a 37 °C durante 18 a 24 h. Finalizada la incubación, los caldos de APW y BPW fueron analizados simultáneamente por PCR y sembrados en medios de TCBS y CHROMagar. Las placas fueron incubadas durante 16-24 h a 37 °C y las colonias fueron seleccionadas e incubadas en TSA al 2% NaCl y NA para su posterior identificación mediante la PCR.

5.3.5. Análisis por PCR

5.3.5.1. Extracción de DNA genómico

Las alícuotas de caldos de APW y BPW fueron utilizadas para la extracción de DNA. Un mililitro de caldo fue centrifugado a 2.000 rpm durante 2 min para descartar las partículas en suspensión. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y fue centrifugado nuevamente a 10.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante resultante fue descartado y el sedimento se resuspendió en 300 ml de buffer 1xTE (10 mM Tris, pH 8; 0,1 mM EDTA) y se centrifugó a 12.000 rpm durante 7 min. El precipitado fue resuspendido en 300 ml de Chelex al 5% (BioRad, Hercules, California) en agua estéril y calentado a 56 °C durante 20 min. Con el fin de lisar las células, la suspensión fue hervida a 100 °C durante 10 min e inmediatamente colocada en hielo 2 min. El lisado se centrifugó una última vez a 13.000 rpm a 4 °C durante 5 min y el sobrenadante final que contiene el DNA se transfirió a un nuevo eppendorf para su almacenamiento a -20 °C hasta su uso para el análisis de PCR.

Los aislamientos también fueron confirmados por análisis de PCR. Para la extracción de DNA, las cepas estuvieron cultivándose durante la noche en TSA al 2% de NaCl y en NA a 37 °C. Una colonia fue transferida a 5 ml de caldo Luria-Bertani (LB) al 2% NaCl para *V. parahaemolyticus* y Luria-Bertani (LB) sin NaCl (ver anexo, medio 14) para el *V. cholerae* y se incubaron durante la noche a 37 °C en un baño con agitación. Un ml de caldo de cultivo fue transferido a un tubo de 1.5 ml y se centrifugó a 9.000 × g durante 7 min. El precipitado fue resuspendido en 300 ml de buffer TE y hervido durante 10 minutos para lisar las células. El lisado se centrifugó a 10.000 × g a 4 °C durante 5 min, y el sobrenadante que contenía el DNA fue utilizado directamente en la PCR.

5.3.5.2. Detección por PCR

La presencia de *V. parahaemolyticus* en caldos y la confirmación de las colonias fueron detectadas mediante el uso del gen específico de *V. parahaemolyticus* *Vp-toxR*, de acuerdo con el protocolo de PCR descrito por Kim y col. (Kim et al., 1999). La presencia de genes *tdh* y *trh* (genes relacionados con la virulencia), tanto en caldo como en cepas se determinó mediante ensayos de PCR independientes para cada gen, de acuerdo con Tada y col. (Tada et al., 1992).

Para la detección de *V. cholerae* por PCR, el procedimiento empleado para la confirmación de estas bacterias en caldos de cultivo y en colonias estuvo basado en el gen específico *ompW* descrito previamente por Nandi y col. (Nandi et al., 2000). La presencia de especímenes patógenos que poseen la toxina cólerica *ctxA* de *V. cholerae* se han investigado directamente de acuerdo con Lipp et al. (Tada et al., 1992; Lipp et al., 2002).

Todas las PCR se llevaron a cabo en un termociclador PTC200 (MJ Research, South San Francisco, California). Los productos de PCR fueron verificados por electroforesis en geles de agarosa al 1,6% (agarosa tipo II, Sigma-Aldrich, EE.UU.) y fueron teñidos con bromuro de etidio (0,5 mg / ml, Sigma). El gel fue fotografiado con un transluminador UV Alpha Innotech 2200 y procesado con un sistema de documentación Alphaimager 2200 (Alfa Innotech, San Leandro, California).

Los siguientes cepas de referencia de *V. parahaemolyticus* se utilizaron como controles positivos en los ensayos de PCR: AQ4037 (*trh* + / *tdh*-), aislada de los viajeros procedentes de las Maldivas que llegaron a Japón en 1985 (Matsumoto et al., 2000); ATCC43996 (*trh*-/*tdh*+) aislada en el Reino Unido en 1997 y VP81, una cepa pandémica (*trh*-/*tdh*+) procedente de la India en 1996. Con respecto a las cepas de referencia de *V. cholerae* empleadas como controles positivos fueron: CECT 569 y la ATCC14035 ambas procedentes de Asia. Estas cepas de *V. cholerae* son O1 y tienen la toxina colérica *ctxA*+

5.3.6. Caracterización de cepas

5.3.6.1. Técnica de Electroforesis en gel por Campo pulsante (Pulsed-Field Gel Electrophoresis ; PFGE)

Esta técnica se basa en una electroforesis en geles de agarosa, que permite separar fragmentos de DNA de hasta 2.000 kb. El equipo se fundamenta en la propiedad que tienen las moléculas grandes de DNA, de fraccionarse en geles de agarosa si son sometidas alternadamente a dos campos eléctricos no homogéneos de orientación perpendicular. Esta técnica fue realizada según la técnica normalizada "One-Day (24-28 h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of Non-typhoidal *Salmonella* by PFGE" (Centers for Disease Control and Prevention, 2002), adaptada al *V. parahaemolyticus* mediante

el empleo de enzimas de restricción diferenciados y condiciones de electroforesis propias (Martinez-Urtaza et al., 2004). El DNA cromosómico fue digerido con 30 U de NotI (Promega, Southampton, United Kingdom), a 37 °C durante 4 h. Los fragmentos de restricción del DNA fueron resueltos en geles de agarosa SeaKem Gold Agarose (Cambrex, Baltimore, MD) en 0.5X buffer TBE. También se utilizó DNA de *Salmonella Braenderup* H9812 como marcador de tamaño, y fue digerido con 50 U de XbaI (promega, Madison, WI) a 37 °C durante dos h. Los tiempos de pulso fueron de 2 a 40 s durante 18 h a 6,0 V/cm. Los patrones de restricción se compararon con el software BioNumerics (Matemática Aplicada, Bélgica).

5.3.6.2. Serología

Todos los aislamientos positivos para el gen *tdh* y *trh* de *V. parahaemolyticus* fueron sometidos a la serotipificación por pruebas de aglutinación con antisueros específicos de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Denka-Seiken, Tokio, Japón).

Con respecto al *V. cholerae*, se realizó la serología por aglutinación de antisueros específicos para los serogrupos O1 y O139.

5.3.7. Parámetros ambientales

Los parámetros ambientales empleados en este estudio fueron temperatura ambiental, lluvia, recuentos de fitoplancton, transmitancia, fluorescencia, temperatura oceánica y salinidad. La temperatura ambiente fue considerada como el promedio de las temperaturas registradas en un día. La dirección del viento fue medida como el tiempo en horas que el viento sopla en cada uno de los cuatro cuadrantes predominantes (noroeste, noreste, suroeste y sureste). Las precipitaciones se midieron como mm de precipitación diaria y el caudal del río fue calculado como el volumen diario de agua en m³/s del río Umia. Los parámetros oceanográficos (salinidad, temperatura del agua de mar y recuento de fitoplancton) fueron medidos como promedio semanal.

Los datos de la temperatura ambiente, el viento, las horas de sol y la lluvia fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Meteorología del Ministerio

de Medio Ambiente y los parámetros oceanográficos como temperatura del agua de mar, salinidad, transmitancia, fluorescencia y recuentos de fitoplancton fueron obtenidos de datos proporcionados por el seguimiento del programa del medio ambiente marino que existe en Galicia y llevado a cabo por el Instituto Tecnológico para el Control del Medio Mariño de Galicia (Intecmar, Xunta de Galicia, Vilagarcía de Arousa). Los datos del caudal del río fueron conseguidos de la estación 564 en el río Umia (coordenadas, 8 ° 38'32, 662"W, 42 ° 36'17,41"N) y proporcionados por la red de Costas de Galicia del Departamento de Gestión del Dominio Público Hidráulico de la Dirección General de Aguas de Galicia de la Xunta de Galicia.

5.4. RESULTADOS

5.4.1. Presencia y Abundancia de *V. parahaemolyticus*

La prevalencia y la abundancia total de *V. parahaemolyticus* en los diferentes puntos de muestreo de la Ría de Arousa entre Febrero y Diciembre de 2007 se muestran en la tabla 14.

Sitios de Muestreo	No de muestras	<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>V. cholerae</i>	
		No Muestras (positivas)	Abundancia Media	No Muestras (positivas)	Abundancia Media
		(incidencia %)	MNP/100g	(incidencia %)	MNP/100g
R1	19	8 (42.1)	266	2 (10.5)	21.9
R2	12	4 (33.3)	21	4 (33.3)	33.5
R3	18	11 (61.1)	666	3 (16.6)	153.3
R4	16	7 (43.7)	61.3	6 (37.5)	34.3
R5	12	4 (33.3)	29	5 (41.6)	36.5
Total	77	34 (44.2)	241.84	20(25.9)	59.3

Tabla 14. Incidencia y Abundancia media de *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* en muestras de ostras durante el periodo del estudio.

La presencia de *V. parahaemolyticus* fue detectada en 34 (44.2%) de las 77 muestras analizadas por PCR directa, durante todo el periodo del estudio. *V. parahaemolyticus* se detectó en todos los sitios de muestreo, destacando R3 y R1 como las bateas que presentaron una mayor incidencia y abundancia, con una prevalencia de 61.1% y 42.1% en las muestras de ostras y una densidad media de 666 y 266 MNP/100g, respectivamente (Tabla 14 y Fig 17). El sitio de muestreo R4, también presentó una alta incidencia de *V. parahaemolyticus* (43.7%) pero la abundancia detectada en este punto fue baja (61.3 MNP/100g). Sin embargo, la menor prevalencia y abundancia de *V. parahaemolyticus* fue detectada en R2 y R5, ambos sitios con sólo 4 (33.3%) muestras positivas (Fig 18) y densidades de 21 y 29 MNP/100g, respectivamente. No hubo diferencias significativas en el ratio de detección entre los diferentes sitios de muestreo.

La mayor incidencia se detectó durante los meses de verano con 15 muestras positivas de 19 analizadas (Tabla 15), coincidiendo con altos valores de temperatura de mar (17.07 °C) y salinidad (35.4‰) (Fig. 17). Sin embargo, una elevada incidencia de *V. parahaemolyticus* fue observada en Febrero donde todas las muestras fueron positivas, aunque en este mes se registraron los valores más bajos de temperatura de agua de mar en el estudio (13.7 °C). Por el contrario, la menor presencia de *V. parahaemolyticus* fue en primavera, detectada en 7 muestras positivas de un total de 27 recogidas en estos meses. Aunque la temperatura media más alta fue registrada durante los meses de primavera, llegando a obtener el máximo de temperatura a finales de Junio (18.6 °C), *V. parahaemolyticus* no se detectó en este mes.

Estación del Año	No de Muestras	<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>V. cholerae</i>	
		No Muestras (positiva) (Incidencia %)	Abundancia Media MNP/100g	No Muestras (positiva) (Incidencia %)	Abundancia Media MNP/100g
Invierno	15	7 (46.6)	30.3	6 (40)	56.53
Primavera	27	7 (25.9)	0	13(48.1)	114.30
Verano	19	15 (78.9)	908.6	0 (0)	0
Otoño	16	5 (31.6)	26.1	1 (6.25)	0
Total	77	34 (44.2)	241.8	20 (25.9)	59.27

Tabla 15. Dinámica estacional de *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* en el periodo del estudio.

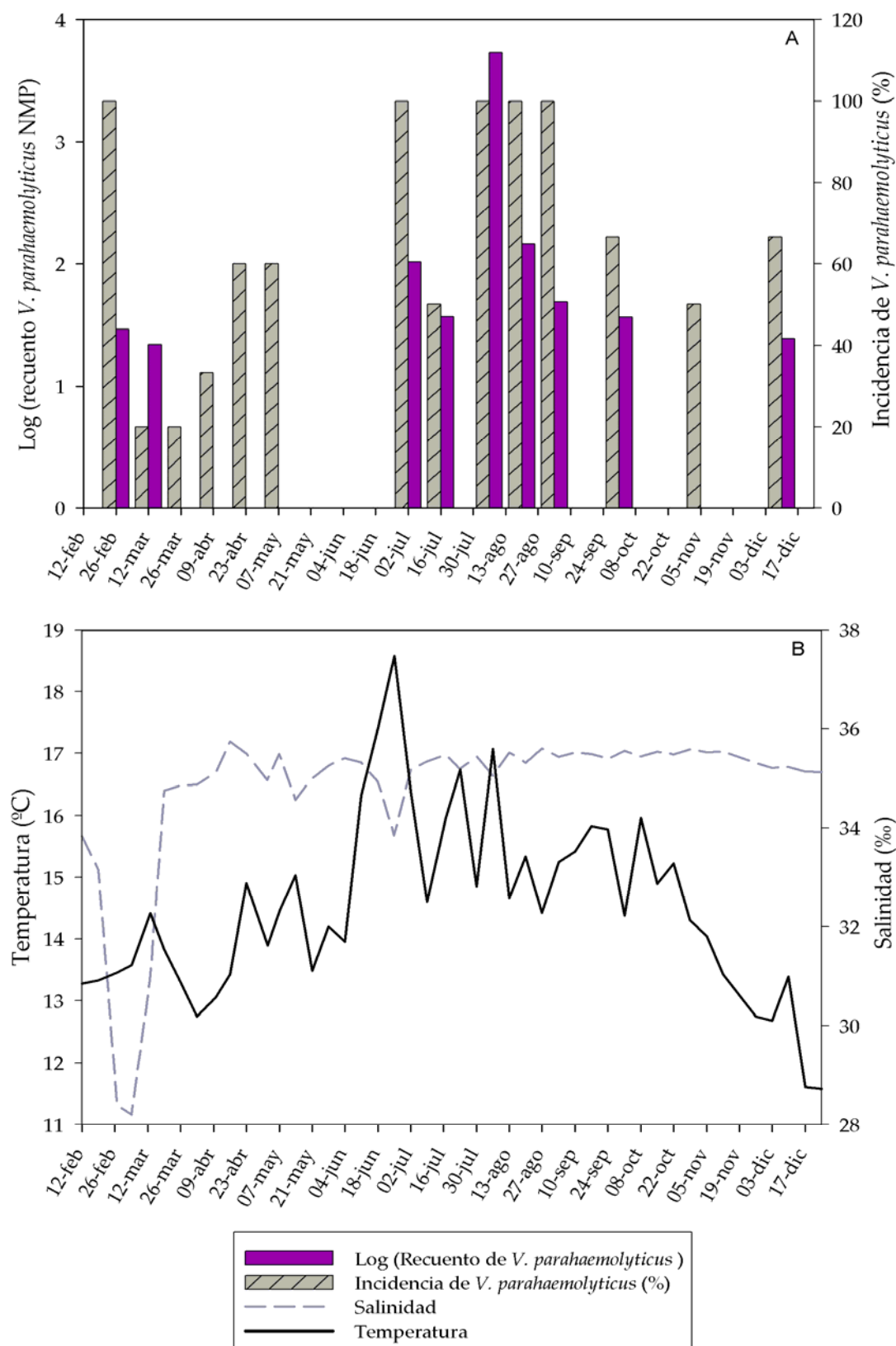


Fig 17. Incidencia general y abundancia de *V. parahaemolyticus* en el periodo del estudio (A) y variaciones de temperatura y salinidad en el mismo periodo (B).

La abundancia total de *V. parahaemolyticus* osciló entre <36 CFU/100g - >11.100 CFU/100g en las muestras de ostras, detectándose los valores más altos durante los meses más cálidos (abundancia media, 908,6 MNP/100g) (Fig 17). Los niveles máximos de *V. parahaemolyticus* fueron encontrados de Julio a Septiembre, alcanzando su máximo en Agosto con una densidad media de 2747,3 MPN/100g. Este dato contrasta con la baja abundancia de esta bacteria en los meses de primavera (Abril-Junio).

5.4.2. Presencia y Abundancia de *V. cholerae*

La presencia de *V. cholerae* se detectó en 20 (25.9%) de 77 muestras entre Febrero a Junio, con una mayor incidencia estacional en primavera (48,1%) (Tabla 15). La dinámica estacional de *V. cholerae* fue completamente diferente comparándola con la de *V. parahaemolyticus*, ya que no se encontró *V. cholerae* durante la segunda mitad del año (Julio a Diciembre), a excepción de una sola muestra recogida en Noviembre (6.25%) (Fig. 19). En base a la cuantificación del NMP, el recuento de *V. cholerae* fue inferior a *V. parahaemolyticus*, registrándose una densidad entre un rango de <36-2100 NMP/100g. La abundancia media de *V. cholerae* durante el periodo del estudio fue de 59.3 NMP/100g, llegando a obtener las concentraciones más altas en los meses de primavera (abundancia media, 114.3 MNP/100g) con un pico máximo en Abril (324.5 MNP/100g). No se detectó *V. cholerae* en los meses de verano y otoño.

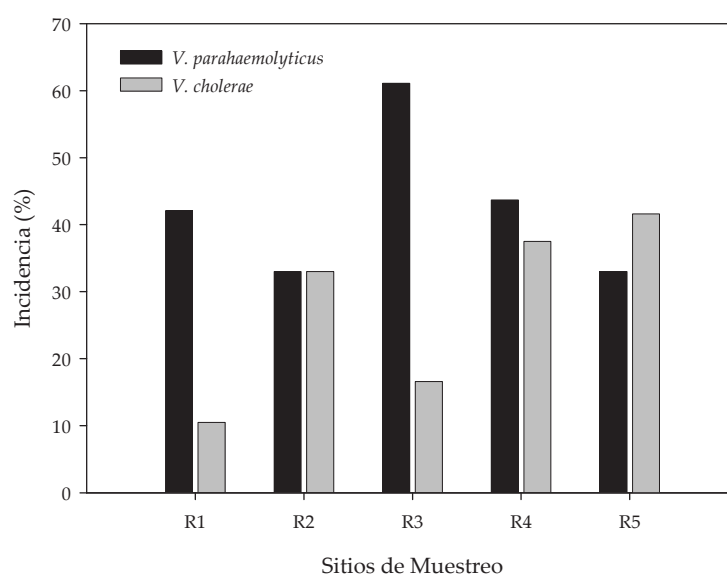


Fig. 18. Incidencia de *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* en los diferentes puntos de muestreo en la Ría de Arousa.

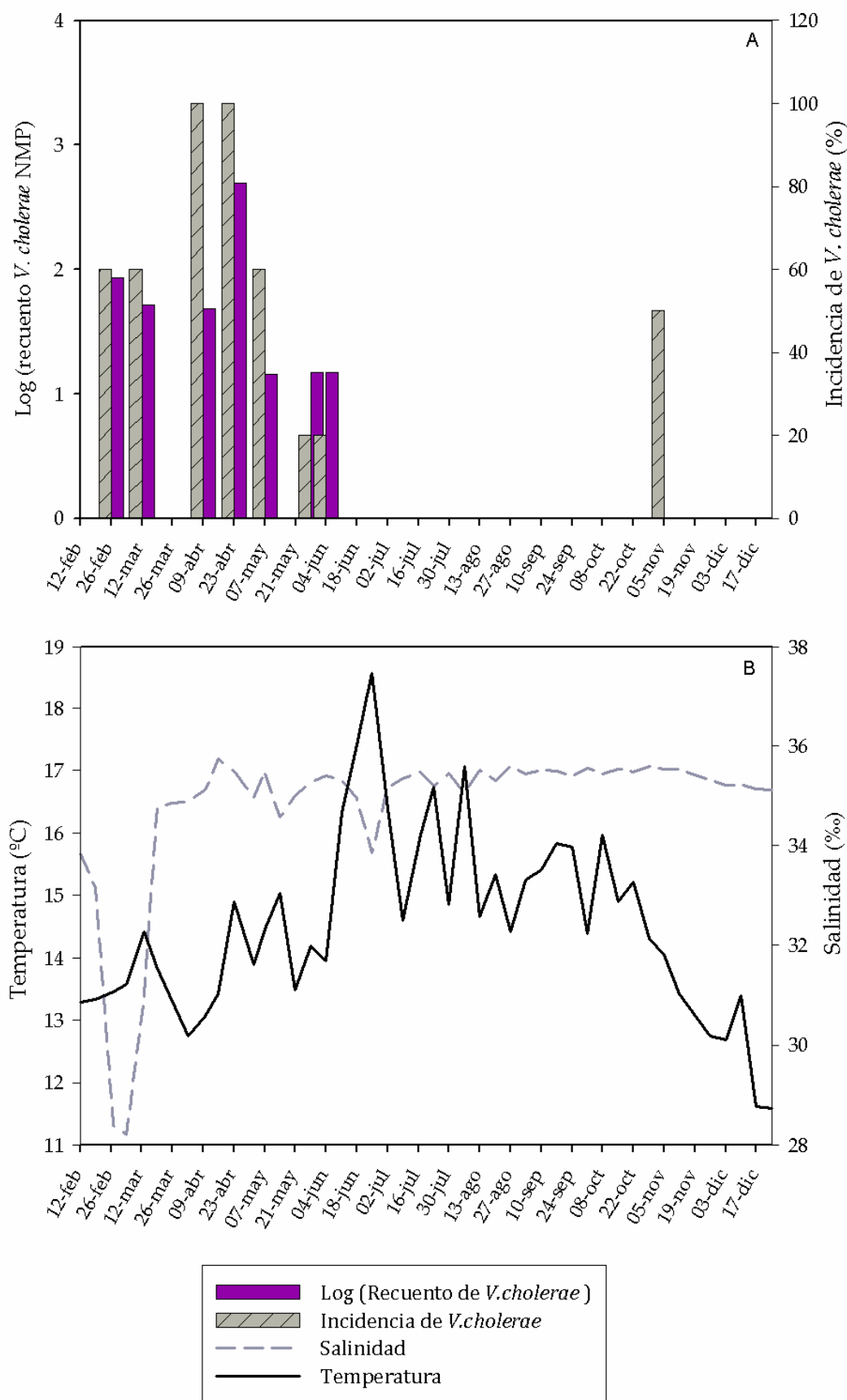


Fig 19. Incidencia general y abundancia de *V. cholerae* en el periodo del estudio (A) y variaciones de temperatura y salinidad en el mismo periodo (B).

Al igual que *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* estuvo presente en todos los sitios de muestreo (Tabla 14 y Fig 18), aunque la incidencia de *V. cholerae* ha sido inferior en los puntos R1 (10.5%) y R3 (16.3%), donde la detección de *V. parahaemolyticus* fue mayor. La abundancia de *V. cholerae* fue baja en todos los puntos de muestreo, a excepción del punto R3 donde se detectaron las densidades más altas 153.3 MNP/100g. en tres muestras positivas.

5.4.3. Presencia de genes de virulencia

La presencia de especímenes patógenos de *V. parahaemolyticus* en muestras de ostras ha sido limitada. Las poblaciones de *V. parahaemolyticus tdh+* han sido detectadas en un 5.2% en muestras recolectadas en Agosto (3) y Febrero (1). La detección de *V. parahaemolyticus trh+* fue de un 3.9% en tres muestras positivas obtenidas en Febrero, Agosto y Noviembre. Exclusivamente, la abundancia de *V. parahaemolyticus tdh+* y *trh+* se detectó en Agosto, con densidades de 1.929,7 y 781,7 MNP/100g, respectivamente.

Un total de 336 aislamientos fueron seleccionados de las muestras de ostras, de los cuales 139 cepas fueron detectadas como *V. parahaemolyticus* en presencia del gen especie-específico *Vp-toxR*. Por otra parte, también se investigó la presencia de genes de virulencia. La caracterización de cepas potencialmente patógenas de *V. parahaemolyticus* reveló la presencia de 5 cepas *trh+* con serotipos O3: K58 (1 cepa), O3:K37 (1 cepa) y O1: K58 (3 cepa), aisladas de tres muestras positivas. Por otra parte, sólo se detectó una cepa *tdh+* en el mes de Julio con serotipo O3: KUT. Tres de las 5 cepas *trh+* con serotipo O1:K58 presentaron patrones de restricción idénticos entre ellos pero no se observó ninguna asociación con otras cepas *trh+* aisladas de otras zonas de Galicia obtenidas de previos estudios. Curiosamente, la única cepa *tdh+* se agrupó con las otras dos cepas *trh+* aisladas de las muestras de ostras y presentó serotipos y perfiles de restricción similares relacionados con otros aislamientos detectados en Galicia (Fig 20).

Los genes que codifican para los factores de virulencia de la toxina colérica (*ctxA*), tradicionalmente asociados con las epidemias de *V. cholerae* O1 y O139, estuvieron ausentes en todas las muestras de ostras positivas para *V. cholerae*. Todas las cepas fueron identificadas como *V. cholerae* no O1/no O139.

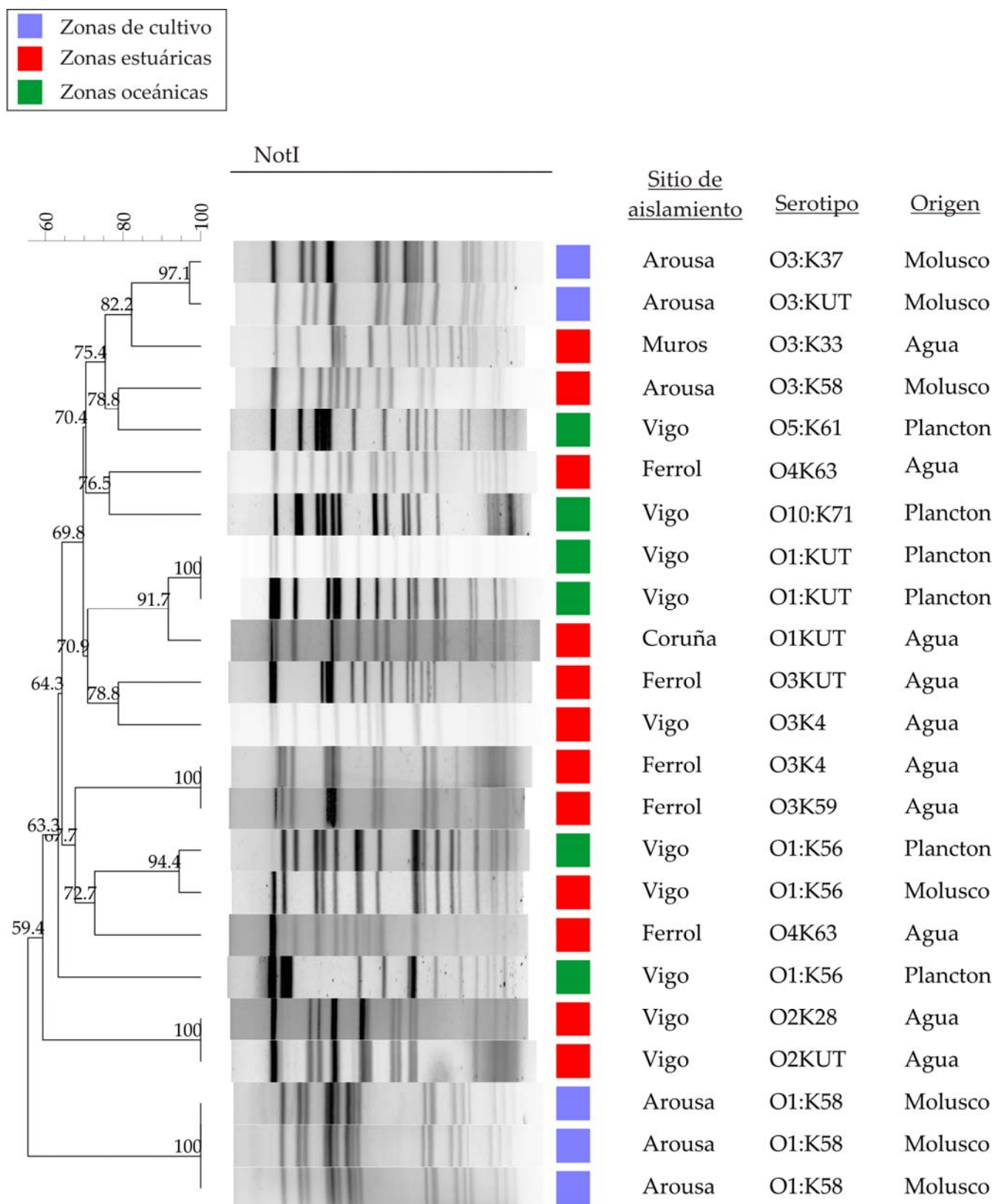


Fig 20. Comparación de la relación genética de los patrones de PFGE de las cepas *V. parahaemolyticus* procedentes de zonas de cultivo con cepas obtenidas de zonas estuáricas y oceánicas.

5.4.4. Asociación con parámetros ambientales y oceánicos

La temperatura y la salinidad del agua del mar en el área del estudio variaron entre 11,6 °C a 18,6 °C y 28,2 ppt a 35,7 ppt, respectivamente (Tabla 16). Aunque el periodo más cálido fue característicamente el verano (temperatura media, 15.6 °C), la temperatura máxima registrada fue en Junio (18,6 °C). En estos meses de verano, se observó el mayor recuento de *V. parahaemolyticus*, lo que nos indica que este factor de temperatura desempeña un papel importante en la dinámica de las poblaciones de *V. parahaemolyticus*. Sin embargo, *V. cholerae* no ha sido detectado en este periodo de verano.

Por el contrario, la salinidad se mantuvo constante durante todo el período (media de 34.6 ppt) a pesar de que se observó una fuerte caída en los meses de invierno, alcanzando el valor mínimo de salinidad (28,2 °C) (Tabla 16). Esta bajada de salinidad también estuvo relacionada con la presencia de ambas bacterias, alcanzando incidencias de 46.6% en *V. parahaemolyticus* y de 40% en *V. cholerae*.

Estación del Año	Temperatura (°C)			Salinidad (‰)		
	Media	Mínima	Máxima	Media	Mínima	Máxima
Invierno	13.8	13.1	14.7	32.8	28.2	35.3
Primavera	14.7	12.8	18.6	35.1	33.9	35.7
Verano	15.6	14.4	17.1	35.4	35.1	35.6
Otoño	14	11.6	16	35.4	35.1	35.6
Total	14.5	11.6	18.6	34.6	28.2	35.7

Tabla 16 .Valores registrados de Temperatura y Salinidad (media, mínima y máxima) en las diferentes estaciones del año.

Las interacciones entre las variables ambientales y oceanográficas y la presencia y abundancia de *V. parahaemolyticus* fueron inicialmente analizadas por el coeficiente de correlación de Pearson y por el análisis de regresión logística simple. La abundancia de *V. parahaemolyticus* estuvo positivamente y significativamente relacionada con la temperatura ambiental y con la lluvia de los días previos a la recogida de muestras ($P<0.05$), aunque la asociación más significativa fue observada con la temperatura media oceanográfica ($P<0.01$). Sin embargo, la prevalencia de *V. parahaemolyticus* no estuvo afectada por otras variables de gran importancia como la salinidad o factores implicados en la producción primaria como el recuento de fitoplancton.

El análisis de regresión de logística simple realizado para la prevalencia de *V. parahaemolyticus* y las variables ambientales mostró relaciones significativas ($P<0.05$) con la temperatura ambiental, lluvia acumulada de los días anteriores al muestreo y temperatura oceánica ($P<0.01$). La temperatura oceanográfica fue el factor dominante que más afectó a la presencia de *V. parahaemolyticus* y presentó una fuerte influencia en la densidad de esta bacteria.

Por otra parte, la dinámica de las poblaciones de *V. cholerae* también estuvo relacionada con las variables oceanográficas. Al igual que en *V. parahaemolyticus*, la temperatura oceánica tuvo una influencia positiva y significativa con la presencia de *V. cholerae* ($P<0.05$) y más específicamente con las temperaturas a niveles más profundos (15m) con valores muy significativos ($P<0.01$).

Por el contrario, la incidencia de *V. cholerae* fue en gran parte influenciada por una disminución en la salinidad ($P<0.05$) y por los demás parámetros que favorecieron la disminución de la salinidad como la acumulación de lluvia los días anteriores al muestreo ($P<0.01$). Además, la detección de las poblaciones de *V. cholerae* fue asociada con el caudal del río Umia, el cual promovió la afluencia de aportes de agua dulce en la ría, destacando una fuerte influencia con el caudal del río los días previos a la recogida de las muestras ($P<0.01$). El factor más importante que afectó a la presencia y abundancia de *V. cholerae* fue la presencia y la abundancia del fitoplancton ($P<0.0001$; O.R.= 1.000), que mostraron una fuerte y significativa asociación. Sólo se identificaron estos dos factores (presencia y abundancia de fitoplancton) como las variables significativas que afectan a la abundancia de *V. cholerae* en la ría de Arousa.

5.5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio revelan un diferente patrón estacional en las poblaciones de *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* en el medio ambiente marino de Galicia. La mayor presencia (78.9%) y abundancia de *V. parahaemolyticus* (valor medio, 908.6 NMP/100g) en la ría de Arousa fue detectada en los meses de verano, coincidiendo también con el período de máxima temperatura del agua del mar en el estudio (15.6 °C). Esta dinámica poblacional de *V. parahaemolyticus* también fue observada en los resultados obtenidos del capítulo 2 en zonas de mar abierto de Galicia y en otras partes del mundo, donde altas incidencias y densidades de esta bacteria fueron localizadas durante los meses de verano cuando las temperaturas del agua de mar fueron más elevadas con respecto a los demás meses del año (Kaneko and Colwell, 1973; FDA, 2005; DePaola et al., 2010). Sin embargo, esta estacionalidad de *V. parahaemolyticus* en la ría de Arousa, contrasta con los resultados obtenidos de las zonas estuáricas de Galicia (capítulo 1), detectándose una alta presencia de las poblaciones de *V. parahaemolyticus* total en los meses de otoño.

Por el contrario, la prevalencia de *V. cholerae* fue limitada a los cinco primeros meses del muestreo (Febrero-Junio), donde la incidencia y abundancia de esta bacteria fue menor (25.9%) con respecto a *V. parahaemolyticus* (44.2%). El patrón de estacionalidad de *V. cholerae* ha tenido su máximo en los meses de Abril a Junio, en un 48.5% de muestras positivas, de acuerdo con otras investigaciones recogidas de la literatura científica (Jesudason et al., 2000; Mohanty et al., 2004; de Magny et al., 2011; Mishra et al., 2012). Por otra parte, esto contrasta con otros estudios que detectaron mayores densidades de *V. cholerae* en el mes de Julio (Mahasneh and Al-Sayed, 1997).

La influencia de los parámetros ambientales, es decir, temperatura, pH, salinidad, lluvia, clorofila, y plancton en la abundancia de *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* está bien establecida en ambientes marinos (Pardío Sedas, 2007; Johnson et al., 2010), y se ha demostrado que son factores importantes en la ecología de *V. cholerae* que influyen en la transmisión de la enfermedad (Huq et al., 2005; Constantin de Magny et al., 2008). El papel de la temperatura en la determinación de la abundancia de *V. parahaemolyticus* en los ambientes marinos y de estuarios ha sido bien documentado, pero la temperatura explica sólo una parte de la variabilidad en la densidad de *V.*

parahaemolyticus (Kaneko and Colwell, 1973; DePaola et al., 2003; Anonymous, 2005; Phillips et al., 2007).

En este estudio, se tuvo en cuenta la temperatura y otros parámetros ambientales que pueden afectar a la prevalencia y abundancia de *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* en muestras de ostras recogidas en la Ría de Arousa. Una fuerte asociación positiva ha sido observada entre la temperatura oceánica y la abundancia de *V. parahaemolyticus* en muestras de ostras. Varios estudios han atribuido la temperatura del agua de mar como el factor clave en la distribución de *Vibrios spp* (Schets et al., 2010; Vezzulli et al., 2010). La influencia de la temperatura oceanográfica en el patrón estacional de *V. parahaemolyticus* muchas veces parece estar controlada por el efecto de la salinidad (Martinez-Urtaza et al., 2008b). La temperatura podría modular la densidad de *V. parahaemolyticus* sólo cuando las aguas cálidas coinciden con periodos de salinidad reducida. Este patrón de los efectos combinados de altas temperaturas y bajas salinidades se ha observado que influye en la abundancia de *V. parahaemolyticus* en otras investigaciones llevadas a cabo en diferentes regiones de América del Norte (Kelly and Stroh, 1988; DePaola et al., 2000). Sin embargo, la presencia y abundancia de *V. parahaemolyticus* en ostras no estuvo influenciada por la salinidad, ya que este factor se mantuvo constante a lo largo del año, a excepción de un descenso en Febrero donde todas las muestras fueron positivas para *V. parahaemolyticus*.

Por el contrario, la salinidad mostró un papel importante en la detección de *V. cholerae* en la ría de Arousa. Esta ría presentó valores estables de salinidad (rango comprendido entre 28.2-35.7) modulados por un patrón de precipitación que fue caracterizado por fuertes lluvias en Febrero y moderadas precipitaciones en el mes de Junio. El mínimo valor registrado de salinidad (28.2‰) fue en Febrero coincidiendo también con el mes de máxima precipitación en el periodo de estudio. Estas asociaciones con las variables oceanográficas han sido observadas en otros registros por tener una fuerte influencia con la presencia de *V. cholerae* (Singleton et al., 1982; Pardío Sedas, 2007; Thongchankaew et al., 2011; Mishra et al., 2012).

En el medio ambiente marino, *V. cholerae* se encuentra unido a las superficies de plantas, algas verdes filamentosas, copépodos (zooplancton), crustáceos e insectos (Huq et al., 1983). La correlación de brotes de cólera y la prevalencia estacional de los blooms de algas ha sido publicada anteriormente (Tamplin et

al., 1990; Epstein, 1993; Colwell, 1996). Igualmente, en este estudio, una fuerte correlación entre la prevalencia y abundancia de *V. cholerae* y el fitoplancton ha sido observada, considerándose tanto la presencia como el recuento de fitoplancton como los factores críticos que limitan la dinámica poblacional y estacional de *V. cholerae*. La abundancia de fitoplancton fue detectada desde Febrero hasta Mayo, con picos máximos en Mayo, sin detectarse a partir de este mes con pequeñas excepciones de baja abundancia en el mes de Noviembre coincidiendo con la incidencia de *V. cholerae* en las muestras de ostras. Sin embargo no se encontró ninguna asociación de estas variables con el *V. parahaemolyticus*.

La presencia de poblaciones potencialmente patógenas de *V. parahaemolyticus* en este estudio ha sido limitada, detectándose sólo la presencia de *V. parahaemolyticus tdh+* en 4 de 77 muestras analizadas. Esto contrasta con bibliografía descrita previamente del primer brote importante de infección de Galicia asociado al consumo de ostras donde todas las cepas analizadas han sido *tdh+* (Lozano-León et al., 2003). Las infecciones causadas por *V. parahaemolyticus* están en gran medida asociadas a cepas que poseen la capacidad de producir la hemolisina termo-estable directa (TDH, thermostable direct hemolysin) (DePaola et al., 2003b). Esto explicaría que en estos últimos años, el riesgo de infección causado por *V. parahaemolyticus* en Galicia ha sido inexistente debido a la poca incidencia de estas poblaciones *tdh+* en muestras de ostras, en contraste con los datos publicados sobre la incidencia de infección de esta bacteria en los Estados Unidos y Asia (FDA, 2005).

Altas densidades de las poblaciones de *V. parahaemolyticus tdh+* y *trh+* fueron detectadas exclusivamente en agosto coincidiendo con el periodo de los meses más cálidos. La estacionalidad de estas poblaciones potencialmente patógenas en este estudio coincide con la detección de infecciones causadas por *V. parahaemolyticus* asociadas al consumo de ostras en años anteriores que también estuvieron reflejadas en el mismo mes (Lozano-León et al., 2003). Por lo tanto, el mayor riesgo de infección según los resultados de este estudio podría estar asociado a los meses de verano donde la incidencia de poblaciones potencialmente patógenas de *V. parahaemolyticus* ha sido en el mes de Agosto.

Con respecto a *V. cholerae*, se ha observado que la presencia de esta bacteria responsable de causar infecciones o brotes asociados al consumo de moluscos o aguas en mal estado, no se detectó en España desde los años 70 del siglo XX, aunque siguen existiendo brotes causados por esta bacteria en zonas endémicas como Asia, África y América del Sur y Central (Guthmann, 1995; Centers for Disease Control and Prevention, 2010; Khwaif et al., 2010; Ahmed et al., 2011). Actualmente, según otras investigaciones, *Vibrio cholerae* no-O1 y no-O139 ha sido detectado en varias regiones de Europa asociado a mariscos o pescados (Lukinmaa et al., 2006; Ottaviani et al., 2009; Scharer et al., 2011). Recientemente, se ha descrito en 2009 un caso de gastroenteritis severa causado por *V. cholerae* no-O1, no-O139 en una persona holandesa inmunodeprimida después de una estancia en España. Pero este caso no fue asociado ni a aguas mal tratadas ni al consumo de mariscos (Rozemeijer et al., 2009)).

Según estos resultados, tanto *V. parahaemolyticus* como *V. cholerae* fueron detectados en ostras de la Ría de Arousa durante el periodo del estudio, aunque su dinámica estacional haya sido diferente. Esta ría se caracteriza por tener la mayor producción de molusco y también por su gran importancia económica debido al sector marisquero, a la pesca, a la acuicultura e industria conservera que se realizan en esta zona. Además, Cambados recibe gran parte del turismo de Galicia, duplicándose su población durante los meses de verano. Aunque no se han registrado casos de infección ni de *V. cholerae* ni *V. parahaemolyticus*, esto podría indicar un serio problema al haber un mayor consumo de marisco en los meses estivales y la detección de *V. parahaemolyticus* potencialmente patógeno ha sido frecuentemente más alta en verano. Por esto, cualquier medida dirigida a minimizar los riesgos para la salud relacionados con el consumo de productos de mar en Galicia, generará una importante mejora en la seguridad alimentaria y en salud pública.

CAPÍTULO 4

-Análisis de la Estructura Poblacional de *Vibrio parahaemolyticus* en Galicia-

6. Análisis de la Estructura Poblacional de *V. parahaemolyticus* en Galicia

6.1. RESUMEN

Multilocus sequence typing (MLST) es una herramienta importante para conocer el origen y analizar la evolución de las bacterias. Aunque se haya confirmado el primer complejo clonal pandémico de *V. parahaemolyticus* por el análisis del MLST, la información que se tiene sobre la evolución y la estructura poblacional de *V. parahaemolyticus* en Galicia es escasa. En este estudio, un total de 69 cepas, 11 procedentes de aislamientos clínicos y 58 cepas ambientales de Galicia fueron analizadas por el MLST. Cincuenta secuencias tipo (STs) fueron identificadas y la mayor parte (47) fueron representadas por un solo aislamiento, sugiriendo un nivel alto de diversidad genética. Diferentes complejos clonales (CC) fueron observados entre las cepas de *V. parahaemolyticus* procedentes de zonas estuáricas y de hábitats oceánicos. Los datos de este estudio indican que *V. parahaemolyticus* presenta una estructura poblacional “semiclonal” en poblaciones estuáricas, sin embargo una alta diversidad fue encontrada en los individuos de las poblaciones oceánicas, lo que sugiere que son poblaciones con frecuentes eventos de recombinación. La diversidad genética de *V. parahaemolyticus* parece estar impulsada principalmente por la recombinación más que por las mutaciones puntuales y el índice del relativo impacto de recombinación/mutación ha sido más alto en poblaciones oceánicas ($r/m = 77$) que estuáricas ($r/m = 2.25$). Este ha sido el primer trabajo realizado en Europa sobre la estructura poblacional de *V. parahaemolyticus* en diferentes ecosistemas, observando que las poblaciones oceánicas presentan una mayor heterogeneidad entre los individuos.

6.2. INTRODUCCIÓN

Vibrio parahaemolyticus es una bacteria halófila marina que está presente como organismo de vida libre en el agua de mar en hábitats estuáricos (Kaneko and Colwell, 1973; Kaneko and Colwell, 1975; Joseph et al., 1982), aunque también pueden sobrevivir en zonas oceánicas unida al zooplancton, sirviéndole como fuente de comida y protección a las poblaciones de *V. parahaemolyticus* bajo condiciones ambientales desfavorables, y como una plataforma para el desplazamiento a través del mar (datos capítulo 2). Según la bibliografía existente, los movimientos de las aguas oceánicas desde zonas lejanas podrían estar directamente relacionados con la introducción de poblaciones patógenas de *Vibrio* en áreas donde antes no habían sido detectadas, y que el zooplancton, y más concretamente los copépodos, son los más probables candidatos para facilitar el transporte. De esta forma, la llegada de poblaciones oceánicas a hábitats estuáricos, constituiría una fuente permanente de *V. parahaemolyticus* que dificultaría la diferenciación de grupos poblacionales a nivel local (Martinez-Urtaza et al., 2008).

A pesar de los avances conseguidos en estos últimos años, la información sobre la estructura y la ecología de las poblaciones patógenas de *V. parahaemolyticus* en el medio ambiente marino sigue siendo muy limitada. Esta situación estuvo en parte debida a la limitación de los métodos analíticos empleados, que se basaban exclusivamente en el estudio de colonias aisladas después de la incubación de las muestras en caldos de cultivo. El avance de las técnicas de biología molecular experimentado en los últimos años y su aplicación al campo de diagnóstico ha permitido mejorar la detección y aislamiento de especímenes patógenos de *Vibrio* en el laboratorio y por otra parte conocer la estructura poblacional de *V. parahaemolyticus* en los diferentes hábitats. Las técnicas de tipificación molecular incluyendo PCR con cebadores arbitrarios (AP-PCR), electroforesis de campo pulsante (PFGE), ribotipificación, y el análisis de enzimas de restricción del genoma, por lo general demuestran un alto grado de diversidad de *V. parahaemolyticus*, aunque proporcionan escasa información sobre la relación genética de las cepas. Durante los últimos años, se han desarrollado y aplicado nuevas técnicas como “Multilocus sequence typing” (MLST) que es una herramienta muy útil para el estudio de las características de las poblaciones de diferentes bacterias patógenas que permite estudiar la estructura de la población en diferentes hábitats de una zona concreta y al mismo tiempo establecer sus relaciones genéticas y las interconexiones entre

diferentes regiones del mundo (Maiden, 2006). Este análisis poblacional aporta información básica sobre los mecanismos diferenciales de adaptación a los distintos ambientes.

El principio del desarrollo de MLST se encuentra en algunos trabajos de genética de poblaciones que intentaron correlacionar la información generada a partir del análisis de isoenzimas con la obtenida mediante secuenciación de los genes analizados (Feil et al., 1996; Smith et al., 1999). En ese proceso, se observó que algunas regiones específicas de los genes analizados eran responsables de la mayor parte de la variabilidad observada, mientras que el resto del locus presentaba un alto grado de conservación. Así que, se decidió analizar en cada gen sólo un fragmento interno de entre 450-500 pb cuyo nivel de variabilidad combinado entre los genes analizados proporcionaba un alto grado de discriminación.

En el MLST, las variaciones en los diferentes locus se detectan de forma directa por secuenciación del DNA de fragmentos de genes seleccionados, permitiendo la identificación de grupos de microorganismos con idénticos (clones) o altamente relacionados genotipos (líneas clonales). Esto permite identificar todas las variaciones, no sólo aquellas que produzcan un cambio en la movilidad electroforética del enzima codificante, como sucede en MLEE (multi locus enzyme electrophoresis). Adicionalmente, la secuencia de DNA es un dato objetivo fácilmente intercambiable entre diferentes laboratorios.

El proceso de selección de los genes, así como de los fragmentos internos de éstos, no es universal, es decir, este proceso debe ser realizado para cada especie bacteriana de forma individual. El proceso de desarrollo es lento y laborioso, y esto limita la aplicación de MLST a aquellas especies en las que ya ha sido desarrollado. No obstante, desde 1998 en que se describió, el método ya ha sido desarrollado para 11 especies diferentes de bacterias (véase información en <http://www.mlst.net/databases/default.asp>), entre las que habría que destacar por su relevancia *Neisseria meningitidis* (Maiden et al., 1998), *Streptococcus pneumoniae* (Enright and Spratt, 1998), *Staphylococcus aureus* (Enright et al., 2000), *Campylobacter jejuni* (Dingle et al., 2001) y *Enterococcus faecium* (Homan et al., 2002). También se ha desarrollado en bacterias patógenas de interés en salud pública (http://www.mlst.net/misc/new_schemes.asp). Entre estas especies, podemos destacar *Listeria monocytogenes* (Salcedo et al., 2003) y *Acinetobacter baumannii* (Bartual et al., 2005).

El proceso de análisis por MLST consiste en un primer paso de amplificación y posterior secuenciación de los fragmentos variables de los siete genes previamente seleccionados. La secuencia de cada uno de los *loci* se alinea con las ya existentes en una base de datos centralizada. Si la secuencia coincide, el programa asigna uno de los alelos ya identificados; en caso contrario, asigna un nuevo número a ese nuevo alelo. La asignación de los alelos se realiza de forma inequívoca al secuenciar ambas hebras de DNA, por lo que las variaciones en la secuencia de DNA son de esta forma “autenticadas”. Una vez establecido un número a cada alelo, y por supuesto siempre utilizando el mismo orden de los genes, podemos generar un perfil alélico que será la combinación de los siete alelos ya asignados. Tras la definición de los perfiles alélicos, la comparación entre las cepas es sencilla.

Publicaciones realizadas han descrito un esquema del MLST que ha permitido determinar las características poblacionales de *V. parahaemolyticus* en Estados Unidos (Gonzalez-Escalona et al., 2008). Este estudio analizó las secuencias parciales de 7 genes de mantenimiento celular (housekeeping), loci ubicados en ambos cromosomas de *V. parahaemolyticus*. Estos 7 genes incluyen *recA* (proteína RecA), *dnaE* (DNA polimerasa III, subunidad alfa), y *gyrB* (DNA girasa, subunidad B) procedentes del cromosoma I y *dtdS* (treonina 3-deshidrogenasa), *pntA* (transhidrogenasa, subunidad alfa), *pyrC* (dihidro-orotasa), y *tnaA* (triptofanasa) del cromosoma II (Gonzalez-Escalona et al., 2008). Durante este estudio se investigó con aislamientos de *V. parahaemolyticus* clínicos y ambientales de diferentes orígenes centrados principalmente en cepas de Estados Unidos. Los datos obtenidos demostraron una gran diversidad genética entre las cepas estudiadas y asimismo se observó una alta tasa de recombinación homóloga. También se pudo observar la existencia de 3 grupos clonales, uno de ellos referente al clon pandémico, lo que pone en relieve una estructura poblacional semiclinal en el grupo de cepas estudiadas. Por lo tanto, el análisis por el MLST confirmó el primer complejo clonal pandémico de *V. parahaemolyticus* (Gonzalez-Escalona et al., 2008). Gracias a esta tecnología se ha podido observar que, a pesar de la gran variabilidad de las poblaciones de *V. parahaemolyticus*, algunos complejos clonales están relacionados con los episodios epidemiológicos y endémicos en diferentes regiones del mundo. La base de datos del MLST de *V. parahaemolyticus* es de acceso público en Internet ([http:// pubmlst.org/vparahaemolyticus](http://pubmlst.org/vparahaemolyticus)).

Las pruebas de recombinación se realizan de manera rutinaria en estudios basados en MLST que examinan la diversidad genética de las poblaciones bacterianas. Se define recombinación homóloga como el proceso por el cual dos secuencias de DNA idénticas o altamente similares intercambian información genética. Este es un mecanismo de intercambio genético que juega un importante papel durante la reparación del DNA, la segregación de cromosomas y la generación de variación genética (West, 2003). La recombinación ha sido ampliamente estudiada en bacterias como *E. coli* (Kowalczykowski et al., 1994) y según la bibliografía descrita se ha observado que la tasa de recombinación homóloga (HRR) varía ampliamente entre diferentes especies (Smith et al., 1993; Feil et al., 2001; Hanage et al., 2006; Pérez-Losada et al., 2006). A pesar de que la incidencia de recombinación en bacterias se demostró experimentalmente hace más de 50 años, (Lederberg and Tatum, 1946), todavía se mantiene la incertidumbre sobre su papel en las poblaciones naturales. El cálculo de la tasa de recombinación, en lugar de simplemente detectar una presencia significativa o la ausencia de eventos de recombinación homóloga, permite una comparación explícita entre las especies.

En poblaciones altamente recombinantes, el origen y la persistencia de las especies puede ser definida principalmente por razones biológicas, ecológicas o por barreras geográficas para el intercambio de genes (Fraser et al., 2007). La importancia general del intercambio de genes homólogos en la definición de especies microbianas todavía no está claro, sin embargo, las tasas de recombinación homóloga pueden variar ampliamente y los datos disponibles se centran principalmente en poblaciones patógenas que representan un estrecho espectro de la diversidad ecológica y filogenética en el mundo microbiano (Vos and Didelot, 2008).

Varios métodos están disponibles para identificar eventos de recombinación homóloga y otros parámetros de las secuencias. Sin embargo, hay diferentes análisis que varían en su capacidad para detectar recombinación (Posada, 2002; Stumpf and McVean, 2003; Didelot and Falush, 2007), haciendo comparaciones de las bases de datos de la bibliografía existente. En este sentido, hemos analizado los datos obtenidos de *V. parahaemolyticus* por el MLST usando el método de coalescencia implantado en el paquete del programa Clonalframe (Didelot and Falush, 2007). La coalescencia es un modelo de genética de poblaciones que rastrea la ascendencia de los individuos actuales en el tiempo para conocer su último ancestro común (Kingman, 1982). Este método estima la

probabilidad relativa de que un nucleótido se cambia como resultado de la recombinación en relación a la mutación puntual (r / m), que es una medida directa del impacto relativo de la recombinación en la diversificación de secuencias (Guttman and Dykhuizen, 1994)

El conocimiento de la naturaleza y la frecuencia de recombinación es importante para determinar la estructura genética de las poblaciones bacterianas. Si no existiera la recombinación cromosómica en bacterias, las poblaciones bacterianas tendrían una estructura clonal. La variación genética en la población vendría dada, fundamentalmente, por la mutación. Esto implicaría que las poblaciones naturales de bacterias serían mezclas de líneas evolutivas más o menos independientes. Como consecuencia, los distintos alelos en los loci estudiados, no estarían asociados al azar sino que serían frecuentes combinaciones de alelos. Esto sería efecto de los cambios en las frecuencias de determinados loci, como resultado de la acción de la selección sobre otro locus distinto. En estas circunstancias, hablamos de que existe un desequilibrio de ligamento. Por otro lado, si la recombinación cromosómica fuera muy frecuente, no cabría esperar la asociación entre alelos, ya que las distintas combinaciones serían deshechas por la acción de la recombinación. En estas circunstancias se habla de que los alelos se hallan en un equilibrio de ligamento.

Como se ha visto, las estructuras de poblaciones bacterianas son complejas y frecuentemente controvertidas, sobretodo, debido a la incertidumbre acerca de la frecuencia y el impacto de recombinación en las bacterias. La existencia de clones dentro de la población y el desequilibrio de ligamento entre los alelos de diferentes locis, es frecuentemente citado como evidencia de tasas bajas de recombinación. Pero este planteamiento está cambiando con los resultados obtenidos a partir de las secuencias de nucleótidos. Se ha visto que la recombinación es común en genes metabólicos implicados en vías centrales (genes housekeeping) en algunas bacterias, y que los niveles de desequilibrio de ligamento entre los alelos pueden ser debidos algunas veces a una estructuración ecológica o geográfica de la población o a una incorrecta elección de la muestra por no ser representativa en la población, en vez de una tasa baja de recombinación (Maynard- Smith, J., et al., 1993).

En consecuencia, el objetivo de este estudio fue conocer con precisión la presencia e importancia de las poblaciones patógenas de *V. parahaemolyticus* en Galicia e identificar los hábitats que favorecerán su presencia. Asimismo, se podrá establecer la relación filogenética y la estructura poblacional de *V. parahaemolyticus* e inferir los cambios genéticos que hayan podido promover su adaptación a nuevos nichos ambientales. Las cepas obtenidas en Galicia fueron comparadas con una colección de cepas de distintos países europeos y de otras partes del mundo para analizar la estructura poblacional a nivel continental y mundial para elucidar la capacidad infecciosa real de las cepas ambientales aisladas en comparación con las cepas de origen clínico.

6.3. MATERIAL Y MÉTODOS

6.3.1. Aislamientos bacterianos.

Se seleccionaron un total de 69 cepas, de las cuales 11 proceden de aislamientos clínicos y 58 de fuentes ambientales (aguas estuáricas, ostra y zooplancton) (Tabla 17 y 18). Estas cepas clínicas fueron aisladas de distintas áreas (Estados Unidos, Inglaterra y España) y en diferentes años (de 1988 a 2004). Con respecto a las cepas ambientales, 53 cepas fueron seleccionadas del cepario de laboratorio y los 5 aislamientos restantes procedieron de muestras de ostras de Estados Unidos. Estas cepas ambientales de *V. parahaemolyticus* fueron aisladas de distintas zonas de Galicia (A Coruña, Ferrol, Cambados y Vigo) y en un periodo comprendido entre el 2005-2007. Se eligieron cepas representativas tanto de zonas estuáricas (agua y ostras) como oceánicas (zooplancton) para conocer la estructura poblacional de *V. parahaemolyticus* en Galicia. Todos los aislamientos fueron cultivados durante toda la noche en medio líquido LB al 2% de NaCl a 37 °C para su posterior extracción del DNA.

Cepa	Región de Aislamiento	Año	Fuente	Origen	Serotipo	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	CC	ST
PY233	Vigo	2006	O	Plancton	O1:Kut	-	-	CC1	ST27
EU.PR101	Vigo	2005	O	Plancton	O1:KUT	-	-	S	ST37
PR99	Vigo	2005	O	Plancton	O3KUT	-	-	S	ST38
N139	Vigo	2006	E	Agua	O2K28	-	-	S	ST33
PY199a	Vigo	2006	O	Plancton	O1:KUT	-	-	CC7	ST21
J49	A Coruña	2006	E	Agua	O4K63	+	-	CC8	ST24
BWC290b	A Coruña	2006	E	Agua	O4K63	+	-	CC8	ST14
EU.BWV290	A Coruña	2006	E	Agua	O4K63	+	-	S	ST31
OJL90-B	Cambados	2007	E	Ostra	O3:KUT	+	-	CC5	ST19
EU.22520	Vigo	2003	E	Molusco	O4:K11	+	-	S	ST28
J48	A Coruña	2006	E	Agua	O4K63	+	-	S	ST32
EU.APW82	Vigo	2005	O	Plancton	O10:K71	+	-	S	ST30
BWC230	Ferrol	2006	E	Agua	O4K63	+	-	CC8	ST22
BWC253	Ferrol	2006	E	Agua	O4K63	+	-	CC8	ST15
O345	Ferrol	2006	E	Agua	O4K63	+	-	S	ST34
BWC330	Ferrol	2006	E	Agua	O3K4	+	-	CC5	ST16
BWC348	Ferrol	2006	E	Agua	O3K59	+	-	CC5	ST17
Ma189	Ferrol	2006	E	Agua	O5K71	-	+	CC9	ST4
O63	Ferrol	2006	E	Agua	O3KUT	-	+	S	ST45
N41	A Coruña	2006	E	Agua	O10KUT	-	+	CC6	ST5
N295	Ferrol	2006	E	Agua	O5K60	-	+	S	ST42
N113	Ferrol	2006	E	Agua	OUTKUT	-	+	S	ST39
O311	Ferrol	2006	E	Agua	O6K18	-	+	S	ST43
PY200	Vigo	2006	O	Plancton	OUT:KUT	-	+	CC2	ST13
PX132	Vigo	2006	O	Plancton	OUT:KUT	-	+	CC2	ST2
100L	Vigo	2005	O	Plancton	OUT:KUT	-	+	CC2	ST2
N10	A Coruña	2006	E	Agua	O10K66	-	+	CC6	ST3
N61	A Coruña	2006	E	Agua	O1KUT	-	+	CC7	ST25
PM290	Vigo	2006	O	Plancton	O1:K56	-	+	CC4	ST11
EU.PM290v34	Vigo	2006	O	Plancton	O1:K56	-	+	S	ST35
N275	Ferrol	2006	E	Agua	OUTKUT	-	+	S	ST40
PSPB18.5	Vigo	2005	O	Plancton	O1:K56	-	+	CC1	ST26
N53	A Coruña	2006	E	Agua	O3KUT	-	+	CC10	ST10
OAG99-A	Cambados	2007	E	Ostra	O1:K58	-	+	CC3	ST7
OAG100-A	Cambados	2007	E	Ostra	O1:K58	-	+	CC3	ST1
OAG101-B	Cambados	2007	E	Ostra	O1:K58	-	+	CC3	ST6
O76-A	Cambados	2007	E	Ostra	O3:K58	-	+	S	ST46
OAG95-E	Cambados	2007	E	Ostra	O3:K37	-	+	S	ST48
PO142	Vigo	2006	O	Plancton	O5:K61	-	+	CC9	ST20

Cepa	Region de Aislamiento	Año	Fuente	Origen	Serotipo	tdh	trh	CC	ST
PCSPB 24.2	Vigo	2005	O	Plancton	O10:K71	-	+	CC6	ST3
PM398	Vigo	2006	O	Plancton	O10:K71	-	+	CC6	ST18
PQ110	Vigo	2006	O	Plancton	O5:KUT	-	+	S	ST36
PM408	Vigo	2006	O	Plancton	O1:K56	-	+	CC4	ST12
PW274	Vigo	2006	O	Plancton	O5:KUT	-	+	CC9	ST8
IP407	Vigo	2006	O	Plancton	OUT:KUT	-	+	CC2	ST23
PY218	Vigo	2006	O	Plancton	O11:KUT	-	+	S	ST49
PY350	Vigo	2006	O	Plancton	O1:KUT	-	+	CC7	ST21
PY456	Vigo	2006	O	Plancton	O1:KUT	-	+	S	ST50
OAG41-A	Cambados	2007	O	Ostra	O5:KUT	-	+	S	ST47
N52	A Coruña	2006	E	Agua	O5K71	+	+	CC10	ST9
O344	Ferrol	2006	E	Agua	O4K63	+	+	S	ST44
N289	Ferrol	2006	E	Agua	O1KUT	+	+	S	ST41
Ma363	Ferrol	2006	E	Agua	O1KUT	+	+	CC7	ST21

Tabla 17. Información biográfica de las cepas ambientales de *V. parahaemolyticus* de Galicia utilizadas en este estudio. O: Oceánicas, E: Estuáricas, CC: Complejo Clonal, S: Singletón, ST: Secuencia Tipo.

Cepa	Región de Aislamiento	Año	Fuente	Origen	Serotipo	tdh	trh
EU.30825	Vigo	1999	C	Heces	O4:K11	+	-
EU9566	A Coruña	2004	C	Heces	O3Kut	+	-
EU97LpVp2	Laos	1997	C	Heces	O3K6	+	-
EU.9808.1	A Coruña	2004	C	Heces	O3K6	+	-
ATCC11344	Inglaterra	-	C	Heces	O3K7	+	-
EU.Cli447-00	Tarragona	1999	C	Heces	O4:K11	+	-
ATCC43996	Inglaterra	-	C	Heces	O3K4	+	-
USA.BE98.2062	EEUU	1998	C	Heces	O3:K6	+	-
USA.F6976	EEUU	1999	A	Ostra	O11:KUT	+	+
USA.F7107	EEUU	2000	A	Ostra	O1:K30	+	+
USA.94A.7175	EEUU	1994	C	Heces	O4:K9	+	+
USA.88A.5320	EEUU	1988	C	Heces	O4K12	+	+
USA.F6746	EEUU	1999	A	Ostra	O4K8	+	+
USA.90A.5598	EEUU	1990	C	Heces	O4K63	+	+
USA.F6729	EEUU	1999	A	Ostra	O4:K9	+	+

Tabla 18. Información biográfica de las cepas clínicas de *V. parahaemolyticus* procedentes de varios países del mundo. C: Clínica, A: Ambiental.

6.3.2. Amplificación por PCR y secuenciación

Todas las cepas que se muestran en la Tabla 17 y 18 fueron analizadas utilizando el esquema del MLST previamente descrito (Gonzalez-Escalona et al., 2008) utilizando secuencias de los fragmentos internos de los 7 genes housekeeping (HK). Estos siete loci fueron seleccionados de ambos cromosomas y elegidos en base a dos informes previamente publicados de los datos de MLST para *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Chowdhury et al., 2004; Bisharat et al., 2005). Para el cromosoma I, los genes housekeeping que se eligieron fueron el *recA* (proteína RecA), *dnaE* (DNA polimerasa III, la subunidad alfa), y *gyrB* (DNA girasa, la subunidad B). Para el cromosoma II fueron el *dtdS* (treonina 3-deshidrogenasa), *pntA* (transhidrogenasa subunidad alfa), *pyrC* (dihidro-orotasa), y *tnaA* (triptofanasa).

Se realizó la amplificación por PCR de los fragmentos internos de los siete genes (*dnaE*, *dtdS*, *gyrB*, *pntA*, *pyrC*, *tnaA* y *recA*), con un tamaño variable según el locus, que varió desde 423 (*tnaA*) hasta 729 pb (*recA*). Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización a 95 °C durante 45 s, alineamiento o unión del cebador (annealing) entre 58-60 °C durante 45 s y extensión a 72 °C durante 45 s con un paso de extensión final a 72 °C durante 5 min. La temperatura de alineamiento (annealing) fue variable dependiendo del locus. Las concentraciones de los reactivos en un volumen de 100 µL de la mezcla de PCR fueron de: 1 mM de MgCl₂, 0.6 mM de desoxinucleótidos trifosfato, 0.5 µM para cada primer (forward y reverse para cada locus) y 1.5 U/µL de enzima Taq Expand high-fidelity polimerasa (Roche Applied Science). Un nanogramo de DNA fue usado como DNA molde por PCR, y los productos de PCR (10 µL cada uno) fueron analizados en geles de agarosa (tipo II de agarosa, Sigma-Aldrich, USA) a 90V durante 90 min con un marcador de peso molecular estándar. Los productos amplificados fueron visualizados con bromuro de etidio (0,5 µg/ml; Sigma) y fotografiados en un transluminador Alpha Innotech 2200 UV y procesados con un sistema de documentación de gel Alphaimager 2200 (Alpha innotech, San Leandro, California). Los productos de PCR obtenidos fueron purificados con el kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen) y fueron secuenciados en ambas direcciones por la empresa MACROGEN (Seoul, Corea) con primers universales M13F y M13R. Las secuencias de DNA fueron revisadas individualmente y ensambladas. Las alineaciones de estas secuencias se determinaron utilizando el BioEdit (Hall, T. 1999).

Se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de estos fragmentos génicos para ambas cadena de DNA y se observó que la secuencia obtenida del producto secuenciado del gen *recA* no era buena para el análisis debido a problemas de amplificación por los primers diseñados, por lo que se optó por estudiar las diferentes poblaciones de *V. parahemolyticus* de Galicia eliminando este locus y realizando un estudio poblacional con los restantes genes HK.

6.3.3. Determinación de las secuencias tipo y los complejos clonales

Los alelos de cada locus fueron diferenciados para cada cepa, y fueron asignados de acuerdo con el programa DnaSP 5.10 (DNA Sequences Polimorphism) (Rozas et al., 2003). Las secuencias tipo (ST) y los complejos clonales (CCs) fueron determinados por el software Bionumerics (Matemática Aplicada, Sint-Martens -Latem, Bélgica). A cada perfil alélico distinto, se le atribuyó un ST diferente. Los complejos clonales están compuestos por lo menos por dos STs con variantes de uno o dos locis, en las cuales cada ST comparte al menos 4 de los 6 loci con al menos un miembro del complejo clonal. Un singleton se definió como un ST que no se agrupa en una CC. La relación y distribución de los diferentes STs fueron obtenidas por el análisis del “Minimum-Spanning Tree” (MST) basadas en un coeficiente categórico y generado por el software Bionumerics.

6.3.4. Medidas del impacto de la recombinación homologa usando el Clonalframe.

Un uso común evolutivo basado en medir la importancia de la recombinación en bacterias es la tasa de recombinación y mutación q/θ (Milkman and Bridges, 1990). Existen un amplio espectro de métodos para calcular este índice, bien usando técnicas de microevolución (Falush et al., 2001; Feil, 2004) o metodología de la genética de poblaciones (Fearnhead et al., 2005; Jolley et al., 2005). La relación q/θ es una medida de la frecuencia con la que se produce la recombinación en relación a la mutación y por eso tiene una interpretación intuitiva: si por ejemplo $q/\theta = 2$, los eventos de recombinación ocurren dos veces más frecuentes que la mutación en la evolución de la población. Sin embargo, ya que esto ignora la longitud y la diversidad de nucleótidos de los fragmentos

importados, esto no contiene información sobre el impacto real de la recombinación en el cambio evolutivo. Para medir el efecto relativo de la recombinación homóloga sobre la diversificación genética de poblaciones, se utilizó el ratio r/m , o el ratio de la tasa de velocidad a la que los nucleótidos han llegado a ser sustituidos como resultado de la recombinación y mutación (Guttman and Dykhuizen, 1994). Por ejemplo, si $r/m=10$, la recombinación introduce 10 veces más sustituciones nucleotídicas que mutaciones puntuales durante la evolución de la población.

ClonalFrame intenta reconstruir la genealogía clonal con las secuencias de las cepas, así como los eventos de mutación y recombinación que tuvieron lugar en las ramas de esta genealogía, basada en un modelo de coalescencia. Por esto, la principal herramienta de análisis de las secuencias concatenadas para cada locus en este estudio fue el Clonalframe 1.1 (Didelot and Falush, 2007), basado en un algoritmo estadístico que infiere en las relaciones clonales teniendo en cuenta el efecto de la recombinación homóloga. Los valores de r/m y de q/θ también fueron estimados usando ClonalFrame.

Se realizaron dos simulaciones independientes en el Clonalframe, cada una de estas con 500.000 iteracciones. Las primeras 50.000 (10%) de cada simulación fueron descartadas y los filogramas y parámetros resultantes fueron obtenidos a partir de cada 100 generaciones con un total de 400.000. A partir de estas dos simulaciones realizadas se obtuvo un árbol consenso construido por el Clonalframe GUI (Didelot and Falush, 2007).

6.3.5. Análisis genético poblacional

La diversidad nucleotídica para cada locus y su respectivo error estándar fue determinando usando el Mega 5 (Tabla 19). El test de recombinación de LIAN fue usado para calcular el índice de asociación "estandarizado" (I^s_A). Este método estadístico analiza la hipótesis nula del equilibrio de ligamento, es decir, si $I^s_A=0$, los alelos están independientemente distribuidos en todos los loci analizados (los alelos están en equilibrio de ligamiento) y los eventos de recombinación ocurren frecuentemente.

La ratio entre el número de sustituciones no sinónimas (d_N) y sinónimas (d_S) fue calculado por el método de Nei y Gojobori con la corrección Jukes-Cantor

implementado en Mega 5. Esta medida de selección se realizó en cada locus. La hipótesis testada fue para la neutralidad ($d_N = d_S$); si $d_N/d_S < 1$, los sitios no sinónimos están bajo una selección purificadora (selección negativa); si $d_N/d_S > 1$ indica una selección positiva y $d_N/d_S = 1$ indica neutralidad.

El árbol en red o también denominado “splits” obtenido de las secuencias concatenadas tanto para la población total como para las poblaciones estuáricas y oceánicas y el test phi (Φ_w) para la recombinación se realizó utilizando el software de Splits Tree 4.8 (Huson and Bryant, 2006).

6.4. RESULTADOS

6.4.1. Diversidad genética

Un análisis descriptivo de la diversidad nucleotídica y de la ratio de las sustituciones no sinónimas y sinónimas para cada locus se presenta en la Tabla 19. Se identificaron 21 (*pntA* y *tnaA*), 25 (*dtdS*), 29 (*gyrB*), 30 (*pyrC*) y 34 (*dnaE*) alelos por locus en las 53 cepas testadas. La diversidad nucleotídica registrada fue de 0.008 a 0.023, obteniéndose los valores más bajos de diversidad en los genes *pntA* (0.008) y *tnaA* (0.010), siendo también estos dos locus los que presentaron menos variedad de alelos. Los valores más altos fueron detectados en el locus *dtdS*, ya que fue el gen más variable dentro de los 6 loci estudiados.

La ratio de sustituciones no sinónimas a sinónimas (d_N/d_S) para cada locus también se puede observar en la Tabla 19. Todos los genes del MLST, a excepción del *pntA* y *tnaA*, presentaron una ratio $d_N/d_S > 1$ para cada locus usando el test de selección para la neutralidad; lo que nos indica que están bajo una selección positiva. Por el contrario, la ratio d_N/d_S tanto en el gen *pntA* como *tnaA* fue menor que 1, lo que nos revela que están bajo la presión de la purificación, es decir, se fija un mayor número de sustituciones sinónimas (d_S) (sin cambio de aminoácido) que no sinónimas (d_N) (implican un cambio aminoacídico) porque estas últimas son usualmente deletéreas y por tanto eliminadas selectivamente. Asimismo, también se encontraron valores altos y similares de diversidad genética en cada locus (Tabla 19), lo que nos indica una gran heterogeneidad en la estructura de la población de las cepas ambientales gallegas.

Cromosoma- Locus	Tamaño fragmento (pb)	Nº alelos	Diversidad Nucleotídica (ES)	Diversidad Genética	Ratio d_N/d_S ($P < \text{value}$) ^a
I					
<i>dnaE</i>	557	34	0.012 (0.003)	0.9584	4.027 (0.000)
<i>gyrB</i>	592	29	0.015 (0.003)	0.9739	2.986 (0.003)
II					
<i>dtdS</i>	458	25	0.023 (0.004)	0.9829	3.536 (0.001)
<i>pntA</i>	430	21	0.008 (0.002)	0.9037	-3.216 (0.002)
<i>pyrC</i>	493	30	0.011 (0.003)	0.9747	2.522 (0.013)
<i>tnaA</i>	423	21	0.010 (0.003)	0.9461	-3.548 (0.001)

Tabla 19. Variación de las secuencias nucleótidas para cada locus del MLST ^a : La hipótesis testada fue neutralidad ($d_N=d_S$). El valor de P indica la significancia de las diferencias entre d_S y d_N que debe ser de $<0,05$ para el rechazo de la hipótesis a un nivel del 5%.

Cuando los seis loci fueron combinados, se identificó un total de 50 STs diferentes de los perfiles alélicos de la colección de cepas ambientales, indicando un alto índice de diversidad genética (0.9566). De las 50 STs, 47 STs contienen un solo aislamiento, mientras que las restantes STs contienen de 2 a 3 cepas cada uno. El ST2 agrupa únicamente dos cepas procedentes de zonas oceánicas, sin embargo tanto el ST3 como el ST21 agrupa aislamientos de diferentes hábitats, tanto de aguas estuáricas como oceánicas (Tabla 17).

6.4.2. Identificación de Complejos Clonales

El análisis poblacional por el “Minimum Spanning Tree” identificó los 50 STs en 10 complejos clonales (CC1 al CC10), más 22 singletones que fueron definidos como STs que no se han agrupado en complejos clonales. Como se observa en el análisis, se encontraron CCs que se corresponden con ST de ambientes estuáricos (CC3, CC5, CC8 y CC10), CCs exclusivos de ambientes oceánicos (CC1, CC2, CC4) y otros CCs que agrupan cepas de ambos ambientes (CC6, CC7 y CC9) (Fig 21, Tabla 17). Todos los complejos clonales englobaron de 2 a 4 STs.

Tanto el CC2 como el CC4 están formados por 3 y 2 STs, respectivamente, y están compuestos por cepas que forman parte de grupos característicos de las poblaciones de *V. parahaemolyticus* *tdh*⁻/*trh*⁺ en Galicia. Ambos CCs agrupan cepas que comparten serotipo OUT:KUT (CC2) y O1:K56 (CC4). Sin embargo el CC1, también es característico de ambientes oceánicos, y presenta STs que engloban individuos genotípicamente diferentes.

Por otra parte, hay que destacar 4 CCs exclusivos de ambientes estuáricos: el CC3 contiene 3 STs con cepas exclusivamente de ostras, donde todas tienen el mismo genotipo *trh*⁺/*tdh*⁻ y serotipo O1:K58. Otro CC fue el CC5 donde se agrupan especímenes de *V. parahaemolyticus* *trh*⁻/*tdh*⁺, formado por 3 STs que agrupan cepas de distintas fuentes (aguas estuáricas y ostras) y son geográficamente diferentes (Norte de Galicia y Sur). El mayor complejo clonal (CC8) en este estudio estuvo compuesto por 4 STs con cepas que constituyen el clon dominante de *V. parahaemolyticus* *tdh*⁺/*trh*⁻ característico de Galicia. Este CC8 agrupó especímenes de *V. parahaemolyticus* procedentes del norte de Galicia pero de distintos lugares (Coruña y Ferrol), y presentaron el mismo serotipo O4:K63 (Fig 21 y 22).

La presencia de CCs formados por cepas de ambos hábitats (estuáricos y oceánicos) también se vio reflejada en este análisis. El CC6 exclusivo de cepas de *V. parahaemolyticus* *tdh*⁻/*trh*⁺, estuvo compuesto por la ST3 que agrupó aislamientos tanto estuáricos como oceánicos. En este complejo clonal también se observó la presencia de STs exclusivas de ambos ecosistemas (ST5 y ST18). Todas las cepas del CC6 compartieron serotipo (O10). Este CC constituye un grupo clonal característico de las poblaciones de *V. parahaemolyticus* *tdh*⁻/*trh*⁺. El CC7 estuvo constituido exclusivamente por 2 ST, la ST21 que englobó 3 cepas con diferentes genotipos (*tdh*⁺/*trh*⁻, *tdh*⁻/*trh*⁺ y *tdh*⁺/*trh*⁺) y hábitats y el ST25 que incluyó una cepa de origen oceánico con genotipo *trh*⁺/*tdh*⁻. Uno de los CCs que comparten también cepas de diferentes hábitats es el CC9. Este complejo incluyó cepas que forman parte de un grupo representativo de la población de *V. parahaemolyticus* *tdh*⁻/*trh*⁺ detectada en Galicia (Fig 21 y 22). Son cepas que comparten serotipo (O5) aunque su origen sea diferente.

Los 22 singletones no fueron agrupados en los diferentes CCs y han revelado una gran variedad de ST en este análisis, englobando cepas con diferentes genotipos y hábitats.

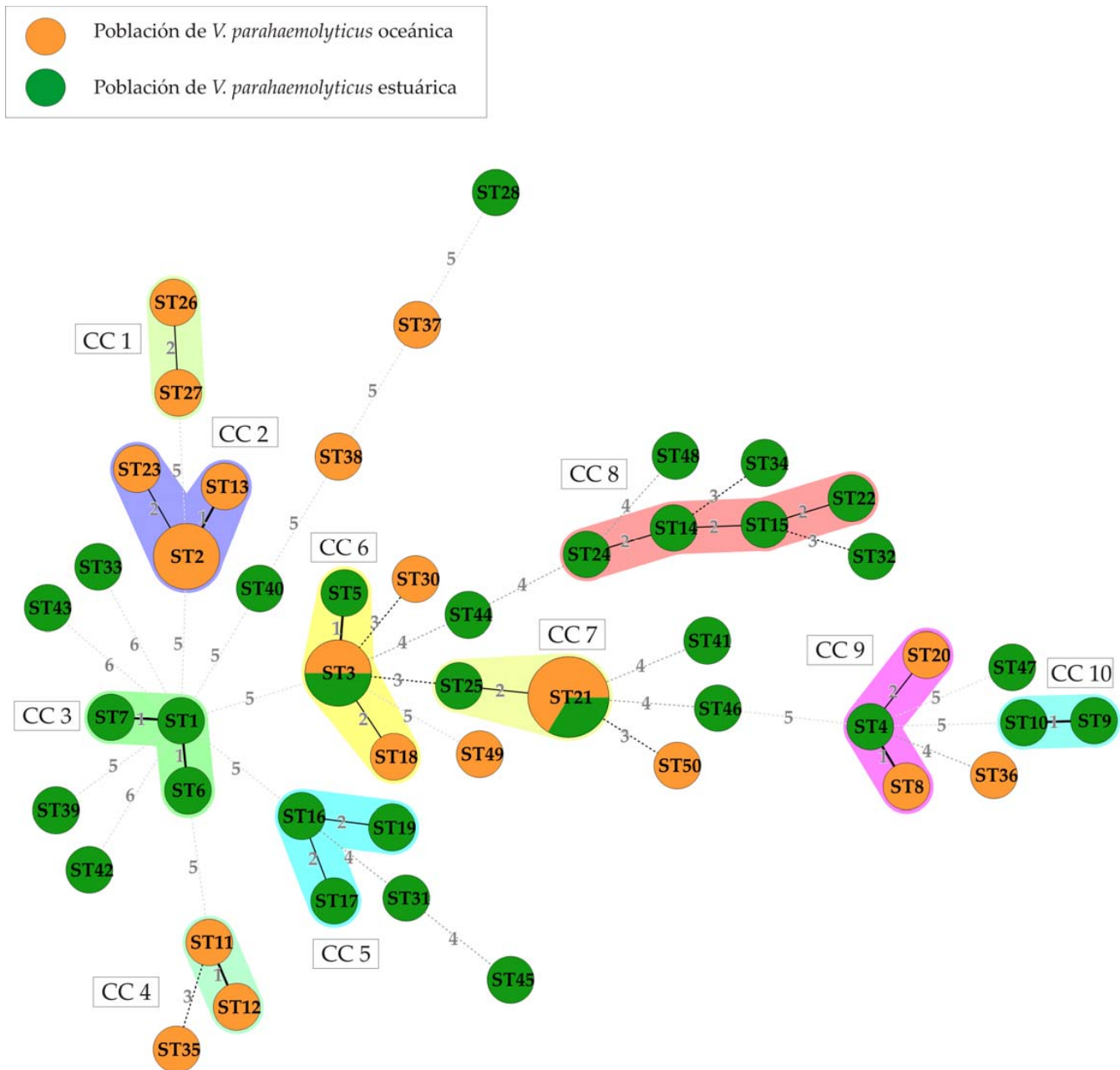


FIG 21. Distribución de las diferentes Secuencias tipo (ST) de *V. parahaemolyticus* obtenidas por el “Minimum-Spanning Tree” (MST) basadas en un coeficiente categórico y generado por el software Bionumerics (Applied Maths). Cada círculo representa una ST y a las agrupaciones de dos o más STs con variantes de uno o dos locus se incluyeron en un complejo clonal (CC). Los colores de los círculos indican las diferentes poblaciones de *V. parahaemolyticus*, como se muestra en la leyenda de la figura y el tamaño del círculo indica la cantidad del número de cepas incluidas en la ST. El número de loci que difiere entre las STs o CCs está indicado en las líneas de conexión entre ellos.

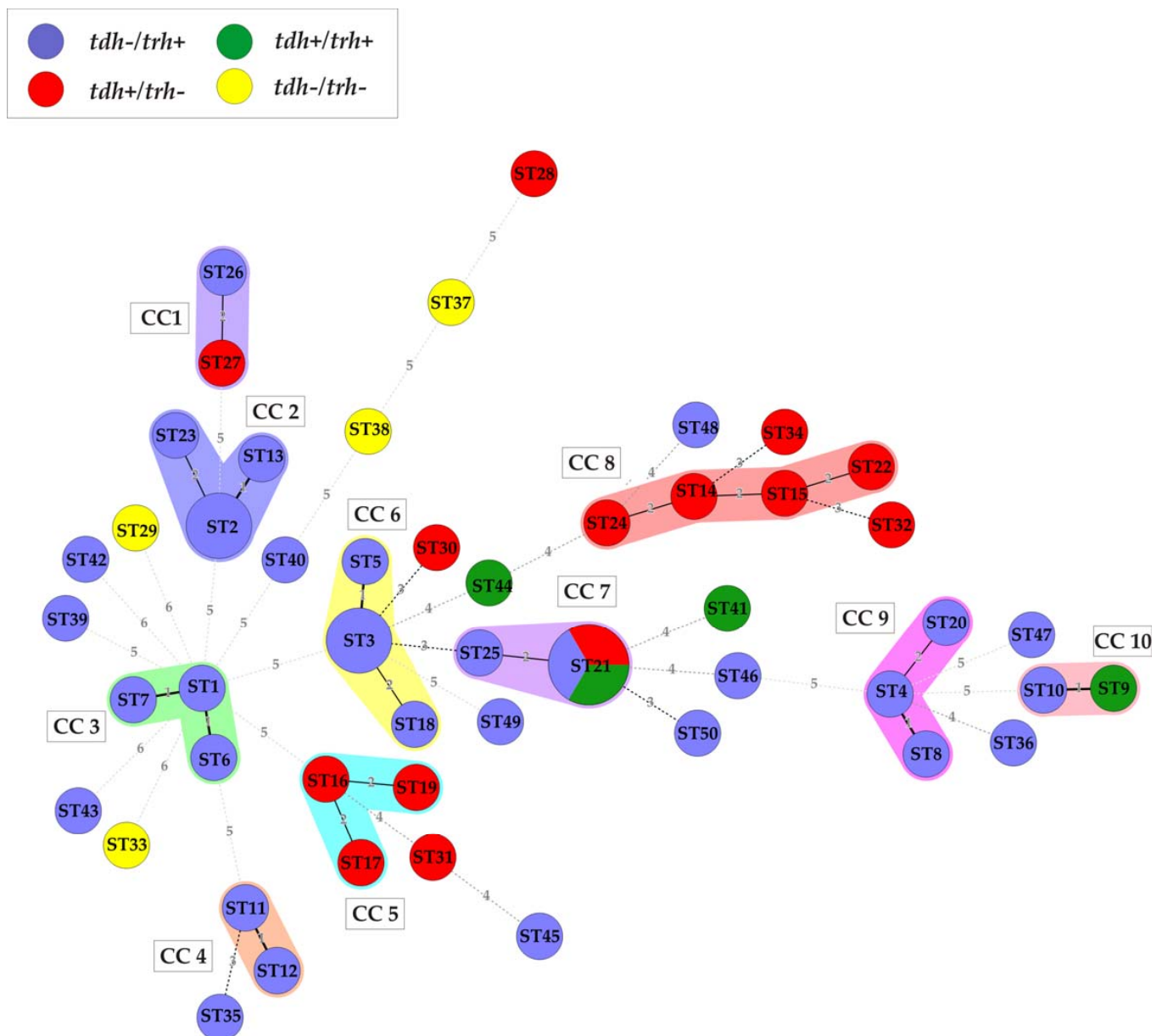


FIG 22. Distribución de las diferentes Secuencias tipo (ST) de *V. parahaemolyticus* obtenidas por el “Minimum-Spanning Tree” (MST) basadas en un coeficiente categórico y generado por el software Bionumerics (Applied Maths). Cada círculo representa una ST y las agrupaciones de dos o más STs con variantes de uno o dos locus se incluyeron en un complejo clonal (CC). Los colores de los círculos indican los distintos genotipos que presentan las cepas de *V. parahaemolyticus*, como se indica en la leyenda de la figura y el tamaño de los círculos muestra la cantidad del número de cepas incluidas en la ST. El número de loci que difiere entre las STs o CCs se muestra en las líneas de conexión entre ellos.

6.4.3. Análisis filogenético de la estructura poblacional de *V. parahaemolyticus*

Para conocer la estructura poblacional de las 53 cepas ambientales de *V. parahaemolyticus*, se realizaron varios análisis filogenéticos. Por un lado se analizó la estructura poblacional de las poblaciones estuáricas donde fueron incluidas 32 cepas procedentes de agua y ostra. Las secuencias nucleotídicas de cada cepa de *V. parahaemolyticus* fueron concatenadas y su relación filogenética fue inferida por Clonalframe para analizar la historia evolutiva de esta bacteria. El árbol consenso obtenido en este análisis identificó 8 clados o linajes y 4 ramas independientes que pertenecen a individuos que no presentan ninguna relación filogenética (Fig 23).

En el linaje 1 se observó una agrupación de cepas de las poblaciones de *V. parahaemolyticus tdh-/trh+* de Galicia procedentes de diversos orígenes (aguas estuáricas y ostras) y con variedad de serotipos. En este análisis se mostró la escasa relación filogenética existente entre los individuos de las poblaciones de *V. parahaemolyticus tdh-/trh+* donde aparecen en ramas independientes o en pequeños clados (IV,VI,VII y VIII) indicando una gran diversidad y variedad de individuos en la población estuárica. Un clado clonal (V) en las poblaciones de *V. parahaemolyticus tdh-/trh+* fue el formado por individuos procedentes de muestras de ostras de la zona de Cambados, los cuales presentaron serotipos O1:K58.

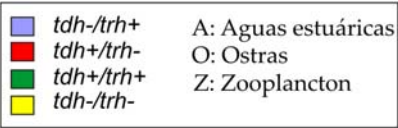
El clado 2 estuvo constituido por aislamientos que constituyen el clon dominante de *V. parahaemolyticus tdh+/trh-* de Galicia (O4:K63), y fueron aislados de la zona Norte de Galicia. El clado 3 representó un grupo característico clonal incluyendo individuos de las poblaciones de *V. parahaemolyticus tdh+/trh-* procedentes del Norte asociados con un espécimen *tdh+* de ostra aislado de la zona de Cambados. Todos estos organismos agrupados en este clado presentan serotipo O3.

En conclusión, este filograma nos revela que los diferentes clados observados en especímenes *tdh+/trh-* son más clonales, a diferencia de las poblaciones de *V. parahaemolyticus tdh-/trh+* donde se aprecia una mayor variedad y heterogeneidad entre los individuos. Además, en este análisis se mostraron similares asociaciones filogenéticas a las observadas por el análisis del

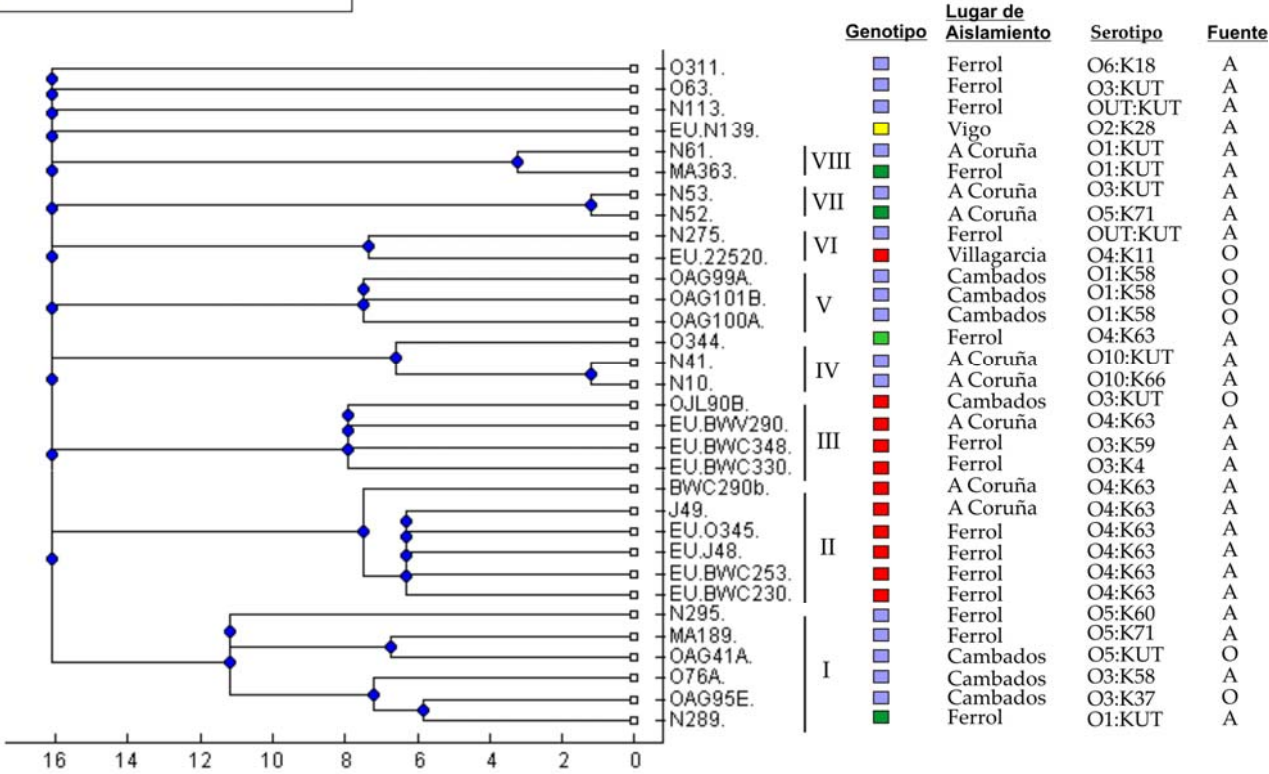
Minimum Spanning Tree usando alelos, y se mantuvieron las mismas agrupaciones, proporcionando robustez al estudio poblacional.

Por otra parte, también se llevó a cabo un análisis con el Clonalframe de la estructura poblacional de *V. parahaemolyticus* procedente de hábitats oceánicos. Se incluyeron un total de 21 cepas obtenidas de muestras de zooplancton recolectadas en la zona sur de Galicia (Fig 22). Analizando el filograma, se observó la presencia de 5 clados, algunos formados por individuos que presentan una mayor variedad genética (clado I, II y IV) y otros clonales. Los clados clonales observados fueron el clado III que incluyó 4 individuos con serotipos OUT:KUT y el clado V que también estuvo formado por 3 cepas con serotipos iguales (O1:KUT). Los especímenes de las poblaciones de *V. parahaemolyticus* de zonas oceánicas no mostraron tanta diversidad como en las poblaciones estuáricas, ya que forman pequeños grupos clonales constituyendo la estructura poblacional de *V. parahaemolyticus* *tdh*⁻/*trh*⁺.

El pequeño número de cepas incluidas en este análisis, no permite resolver cuál podría ser el ancestro común de estas poblaciones tanto estuáricas como oceánicas.



Población estuárica de *V. parahaemolyticus*



Población oceánica de *V. parahaemolyticus*

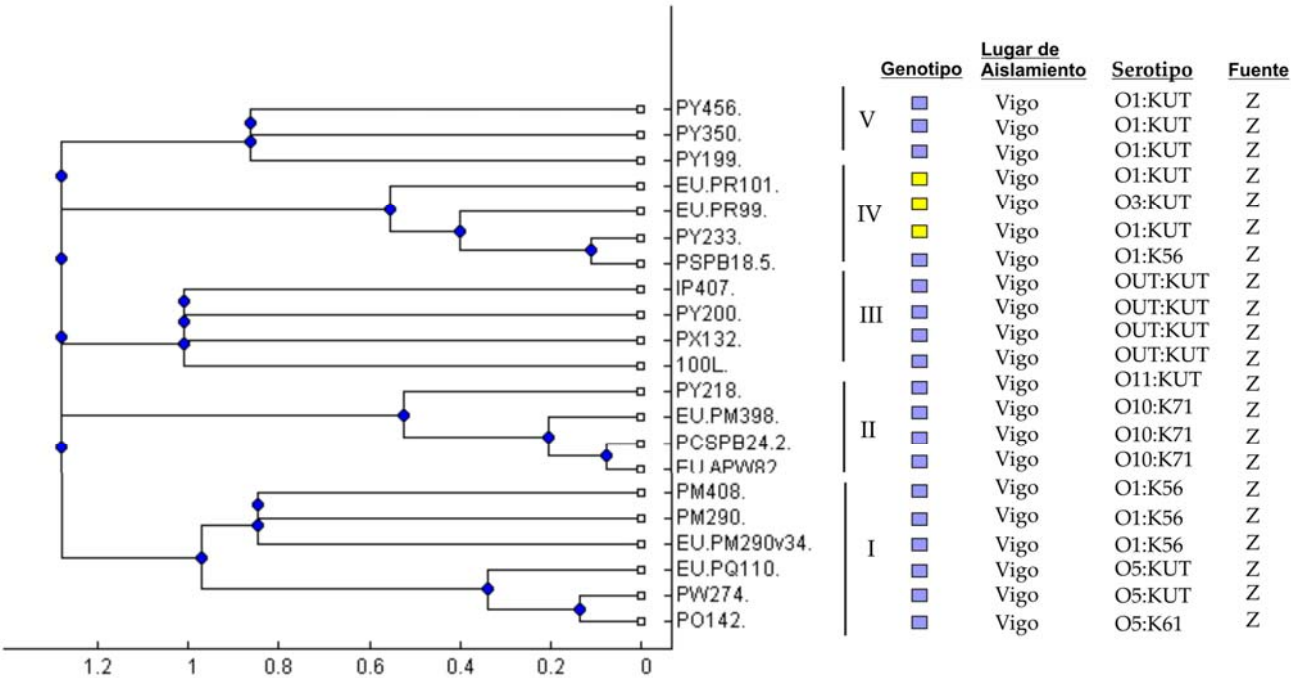


FIG 23. Estudio filogenético obtenido por el Clonalframe a partir de las secuencias concatenadas de los 6 loci obtenidos de MLST de las poblaciones de *V. parahaemolyticus* tanto estuáricas como oceánicas. La escala inferior muestra el tiempo (unidades de coalescencia). A: Aguas; O: Ostra; Z: Zooplancton.

Una vez estudiadas las diferentes poblaciones de *V. parahaemolyticus* por separado, se realizó un análisis incluyendo las secuencias nucleotídicas concatenadas de las cepas ambientales que constituyen este set representativo de las cepas de *V. parahaemolyticus* de Galicia (Fig 24). Un total de 10 clados y 5 ramas independientes fueron mostrados en el filograma, observándose las mismas agrupaciones clonales obtenidas tanto en las poblaciones estuáricas como oceánicas, con la excepción del clado II, III y V en los que se mostró una relación filogenética con un posible antecesor común entre individuos de diferentes hábitats y genotípicamente iguales. La presencia de pequeños grupos clonales ha sido detectada en la estructura poblacional de *V. parahaemolyticus* en Galicia pero hay que destacar la gran diversidad y variedad detectada entre los individuos de las poblaciones de *V. parahaemolyticus* *tdh-/trh+* tanto en muestras de zooplancton como de aguas de estuarios.

Estructura Poblacional de *V. parahaemolyticus* de Galicia

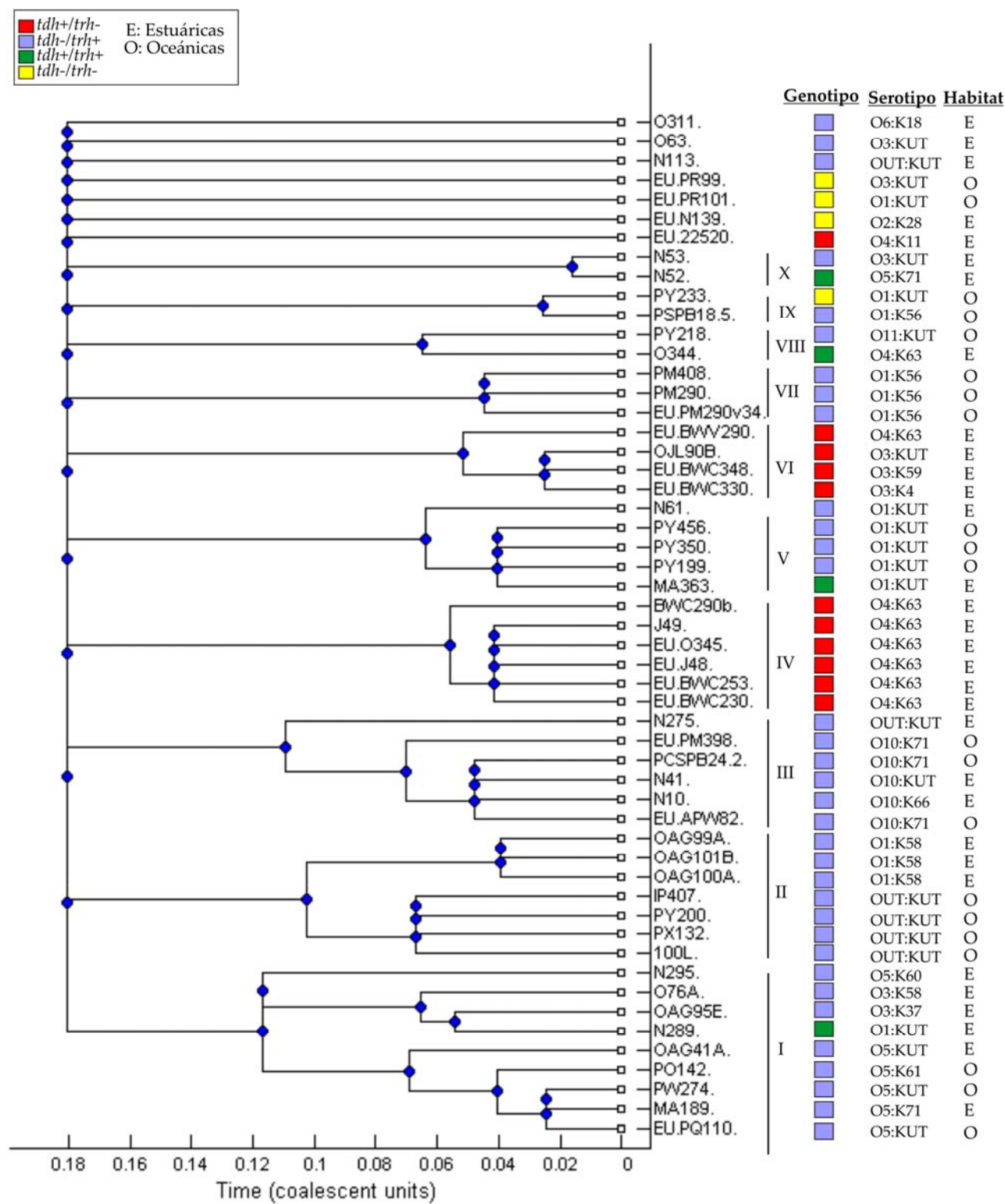


FIG 24. Estudio filogenético obtenido por el Clonalframe a partir de las secuencias concatenadas de las 53 cepas de *V. parahaemolyticus* para el estudio poblacional de esta bacteria en Galicia. E: Estuáricas; O: Oceánicas.

De la misma manera, se ha incluido otro análisis con cepas clínicas de diferentes países (EE.UU, Inglaterra y España) responsables de importantes brotes, así como cepas ambientales de ostras de EE.UU., para ver si existe algún tipo de asociación con los especímenes de la población de *V. parahaemolyticus* de Galicia. Como demuestra la figura 25, un aislamiento clínico de *V. parahaemolyticus* de Reino Unido, aislado en 1970, mostró una relación filogenética con cepas pertenecientes al clon detectado en Galicia en 1999 y con una cepa ambiental con el mismo serotipo O4:K11 aislada en 2003. Otro clado importante que se observa en el filograma es la relación filogenética entre una cepa clínica también aislada en Inglaterra con una cepa gallega de Ferrol en la que son genotípicamente diferentes pero parecen que en algún momento hayan compartido un ancestro común. No hubo ninguna relación con las cepas clínicas responsables del brote de Galicia asociado al clon pandémico.

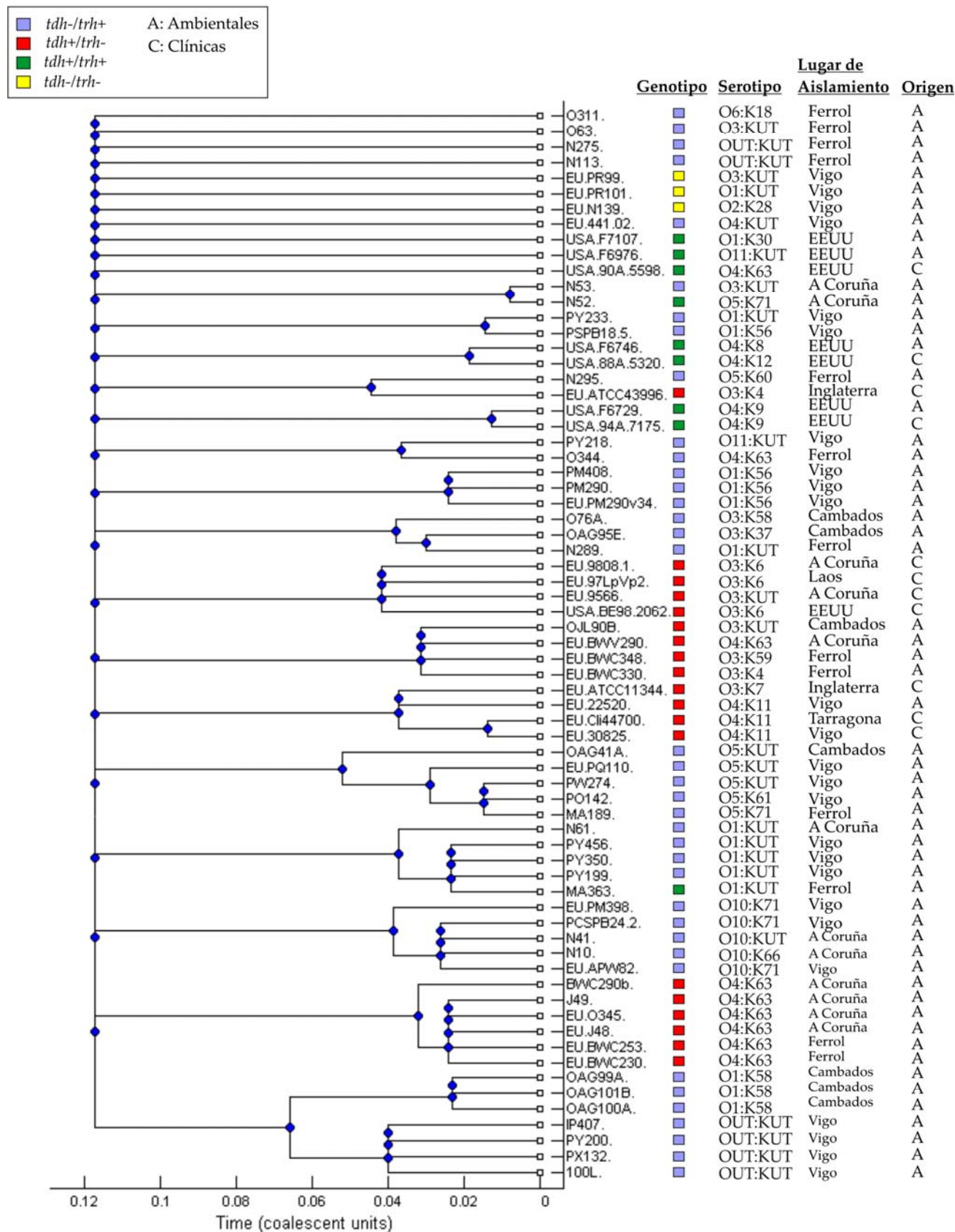
Estructura poblacional de *V. parahaemolyticus* de Galicia con cepas clínicas

FIG 25. Estudio filogenético obtenido por el Clonalframe a partir de las secuencias concatenadas de las cepas ambientales de *V. parahaemolyticus* de Galicia y cepas clínicas procedentes de varias zonas del mundo. C: Clínicas; A= Ambiental.

6.4.4. Recombinación y mutación en las diferentes poblaciones de *V. parahaemolyticus*

Para comparar la tasa de recombinación entre las poblaciones de *V. parahaemolyticus* en las zonas estuáricas y oceánicas, se realizaron varios análisis por separado con el Clonalframe 1.1 con aislamientos representativos de cada grupo poblacional. Los resultados obtenidos del relativo impacto de la recombinación vs mutación expresada como ratio (r/m) y la relativa frecuencia de la recombinación en comparación a las mutaciones puntuales (q/θ) para la población de *V. parahaemolyticus* en zonas estuáricas fueron de 2.25 y de 0.83 respectivamente. Sin embargo, en las poblaciones oceánicas de *V. parahaemolyticus*, se obtuvieron índices de $r/m=77$ y $q/\theta=38.02$. Esto nos indica que el efecto de recombinación en las poblaciones de zooplancton (hábitats oceánicos) fue mucho más alto que en las poblaciones estuáricas, lo que nos sugiere que las sustituciones nucleotídicas ocurrieron más frecuentemente por recombinación que por mutaciones puntuales, es decir, la recombinación juega un papel más importante que la mutación en la heterogeneidad genética de las cepas testadas.

Los individuos de las poblaciones oceánicas de *V. parahaemolyticus* son bastante más recombinantes que los especímenes de las poblaciones estuáricas. Además, se ha observado que las poblaciones de *V. parahaemolyticus* *tdh*⁻/*trh*⁺ presentaron una mayor diversidad que las poblaciones *tdh*⁺/*trh*⁻ que se agrupan formando grupos clonales.

El desequilibrio de ligamento fue determinado para ambas poblaciones de *V. parahaemolyticus* a partir del índice de asociación "estandarizado" (I^s_A) procedente de los perfiles alélicos, un estadístico que cuando es cero, los alelos están en equilibrio de ligamento (eventos de recombinación). Tanto para la población estuárica ($I^s_A = 0.2874$) como para la población oceánica de *V. parahaemolyticus* ($I^s_A = 0.2739$), los valores de I^s_A fueron muy similares y difirieron significativamente de cero ($p>0.001$). Estos datos indican una tendencia al desequilibrio de ligamento entre los alelos, aunque los valores obtenidos son relativamente bajos. Esto es consistente con que los eventos de recombinación están presentes en las poblaciones de *V. parahaemolyticus* de Galicia.

6.5. DISCUSIÓN

El esquema del MLST fue aplicado a una colección de cepas ambientales de *V. parahaemolyticus* de Galicia para la investigación de la estructura de la población en diferentes hábitats y para la determinación de la influencia de recombinación/mutación en la expansión clonal de esta especie. Una base de datos fue creada a partir de otros estudios (Gonzalez-Escalona et al., 2008) que está actualmente disponible en Internet (<http://pubmlst.org/vparahaemolyticus>), en la que se pueden hacer comparaciones con datos generados a partir de laboratorios de todo el mundo. Aplicando el MLST, González-Escalona y colaboradores encontraron una relación clonal del complejo pandémico de *V. parahaemolyticus* O3:K6 (Gonzalez-Escalona et al., 2008) y así pudo ser confirmada la primera propagación pandémica de *V. parahaemolyticus* (Chowdhury et al., 2000b; Nair et al., 2007).

En un principio, el esquema del MLST para nuestro estudio estuvo basado en la variación alélica de siete genes HK, tres del cromosoma I (*recA*, *dnaE*, y *gyrB*) y cuatro del cromosoma II (*dtdS*, *pntA*, *pyrC*, y *tnaA*). Se plantearon una serie de problemas al secuenciar el producto purificado del *recA*, observándose que las secuencias resultantes no eran óptimas para el estudio de la estructura poblacional de *V. parahaemolyticus* en Galicia, con lo que finalmente el estudio se basó en los otros seis genes. En estudios anteriores, se han realizado análisis con el MLST excluyendo el *recA* (Johnson et al., 2009). Esto puede ser debido que el *recA* es un gen muy variable y los primers no están bien optimizados cuando trabajamos con cepas ambientales, aunque se ha mostrado que funcionan correctamente en estudios de cepas clínicas (Gonzalez-Escalona et al., 2008) dando como resultado final un buen producto amplificado para su posterior secuenciación.

La ratio d_N/d_S fue superior a 1 en 4 genes (*dnaE*, *dtdS*, *gyrB*, *pyrC*), indicando que están bajo una selección positiva, donde las mutaciones de los aminoácidos son beneficiosas para la bacteria ya que aumentan su fitness o buen estado y esto promueve la diversidad genética. Por el contrario, la ratio d_N/d_S tanto en el gen *pntA* como *tnaA* fue menor que 1, lo que nos muestra que estos loci están sometidos a una selección estabilizadora o purificadora, indicando que los sitios no sinónimos están evolucionando más lentamente que los sitios sinónimos y esto sugiere que las sustituciones de aminoácidos pueden ser eliminadas. Este efecto es usualmente observado en genes HK, donde domina la selección

purificadora (Charlesworth and Eyre-Walker, 2006). Entre las 53 cepas ambientales de *V. parahaemolyticus* de este estudio, fueron identificados 50 perfiles alélicos diferentes y un promedio de 26 alelos por locus lo que indica un alto grado de diversidad genotípica en la lenta evolución de los loci. La diversidad nucleotídica fue menor en los loci *pntA* y *tnaA* y mayor en el *dtbS* con valores de 0.008, 0.010 y 0.023 respectivamente, de acuerdo con resultados encontrados en previos estudios (Gonzalez-Escalona et al., 2008).

Este esquema del MLST identificó varios complejos clonales exclusivos de las poblaciones estuáricas de *V. parahaemolyticus*, otros de poblaciones oceánicas y otros CCs que comparten cepas de ambos hábitats. Dentro de las poblaciones estuáricas hay que destacar dos complejos clonales (CC8 y CC5) que engloban especímenes de las poblaciones de *V. parahaemolyticus tdh+/trh-*, destacando el CC8 como el clon dominante de las poblaciones *V. parahaemolyticus tdh+/trh-* en Galicia. Por otra parte, se mostró otro complejo clonal (CC3) formado por individuos pertenecientes a poblaciones de *V. parahaemolyticus tdh-/trh+*, exclusivo de muestras de ostras recolectadas en Cambados. Consecuentemente, podemos decir que las poblaciones de *V. parahaemolyticus tdh+/trh-* formaron dos grupos clonales, solamente detectados en zonas estuáricas y no presentaron ninguna relación a las clínicas detectadas en la zona en años anteriores. Con respecto a los especímenes *tdh-/trh+* se observó grupos clonales representativos de estas poblaciones de *V. parahaemolyticus tdh-/trh+* en Galicia y otros individuos que no formaron parte de ningún complejo clonal.

En este análisis, también se han formado complejos clonales característicos de zonas oceánicas como CC2 y CC4 que forman parte de las poblaciones de *V. parahaemolyticus tdh-/trh+*. En contraste, se ha podido observar una gran variedad de especímenes *tdh-/trh+* que no se han agrupado en ningún complejo clonal, lo que nos indica una gran heterogeneidad entre los individuos de la población de *V. parahaemolyticus* tanto estuáricas como oceánicas, indicando también la alta capacidad discriminativa de este análisis. También se han observado CCs que agrupan individuos de ambas poblaciones (CC6 y CC7). Todas las agrupaciones clonales y la diversidad de individuos en ambos hábitats, también fueron observadas en el análisis del Clonalframe, mostrándonos una mayor robustez en la interpretación de los análisis. Un alto grado de diversidad genética se ha observado en este estudio y pudo ser atribuida a la particular selección de las cepas de *V. parahaemolyticus* de nuestra colección. Sin embargo, *V. parahaemolyticus* está presente en diferentes hábitats

como agua de mar, sedimentos, tracto gastrointestinal de los peces, quitina del zooplankton, etc, donde el contenido de nutrientes, temperatura, y otras propiedades físico-químicas (por ejemplo, el pH), difieren. Los cambios en estos parámetros requieren una frecuente adaptación bacteriana a sus nichos. Estos ambientes están a menudo densamente poblados con fagos que pueden facilitar la transferencia del gen entre vibrios y otras bacterias marinas (Jiang and Paul, 1998). Consistentemente, altos valores de diversidad genética fueron observados para *V. parahaemolyticus* y numerosos singletons fueron detectados para dar un diagrama disperso de la población o una estructura filogenética en forma de estrella. Al ser genéticamente muy diversos, se cree que *V. parahaemolyticus* tiene una estructura poblacional "epidémica", es decir, una estructura clonal con alta tasa de recombinación y transferencia lateral de genes, en la cual los clones epidémicos, incluyendo el clon pandémico, se difunden por todo el mundo para provocar una aparición generalizada de infecciones gastrointestinales (Nair et al., 2007; Feil, E.J., 2004).

Las bacterias tienen varios mecanismos de intercambio-transferencia como la transformación, la transducción de fagos y la conjugación, lo que facilita el reemplazamiento de la región del DNA de los genes esenciales con secuencias de genes procedentes de cepas de la misma especie o especies estrechamente relacionadas. Las tasas de recombinación varían mucho entre las diferentes especies bacterianas, pero se han detectado niveles muy altos de recombinación de algunas bacterias marinas y acuáticas, incluyendo *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Vos and Didelot, 2008). El análisis por MLST indicó que el reemplazamiento de la recombinación en las poblaciones oceánicas contribuyó 77 veces más que las mutaciones puntuales de las variaciones genéticas en los aislamientos, considerándose que estas poblaciones presentan un índice de recombinación muy alto (Vos and Didelot, 2008). Sin embargo en las poblaciones estuáricas de *V. parahaemolyticus*, la tasa r/m fue de 2.25, es decir, la recombinación introduce 2.25 veces más substituciones de nucleótidos que mutaciones puntuales durante la evolución de la población. Por lo tanto la recombinación desempeña un papel mucho mayor que las mutaciones puntuales en la generación y en el mantenimiento de la diversidad genética de *V. parahaemolyticus* en Galicia, al igual que en otras investigaciones previas (Yan et al., 2011). Las poblaciones estuáricas de *V. parahaemolyticus* presentaron bajas tasas de recombinación, lo que puede ser debido a los diferentes grupos

clonales encontrados tanto en especímenes *tdh+/trh-* como *tdh-/trh+* en este ecosistema. Todo lo contrario, ocurre en especímenes de *V. parahaemolyticus* *tdh-/trh+* de hábitats oceánicos ya que no son clonales y presentan gran variedad y heterogeneidad comparándolos con las poblaciones de hábitats estuáricos.

Además, estos resultados han demostrado que las poblaciones oceánicas presentan mayores tasas de recombinación que los ecosistemas estuáricos. Según la bibliografía publicada, las poblaciones de *V. cholerae* también son recombinantes (Keymer and Boehm, 2011). *V. cholerae* puede adquirir nuevo material genético por la transferencia natural durante el crecimiento de la quitina, un biopolímero que es abundante en los hábitats acuáticos (por ejemplo, de exoesqueletos de crustáceos), donde vive como un microorganismo autóctono (Bartlett and Azam, 2005; Meibom et al., 2005; Keymer and Boehm, 2011). Esta quitina podría ser la responsable de que estos eventos de recombinación ocurran mediante la transferencia de genes en estos hábitats, lo que nos podría explicar que las poblaciones oceánicas de *V. parahaemolyticus* podría ser más recombinantes debido a que esta bacteria aparece adherida a la superficie de quitina de zooplankton u otros crustáceos en estos ecosistemas.

La estimación de la tasa de recombinación sugiere que la recombinación en aguas no estuáricas es relativamente alta comparándola con otras especies como *Staphylococcus aureus* ($r/m = 0.1$ IC: 0.0–0.6) (Enright et al., 2000), *Listeria monocytogenes* ($r/m = 0.7$ IC: 0.4–1.1) (Salcedo et al., 2003) y *Pseudomonas viridiflava* ($r/m = 2$ IC: 1.2–2.9) (Goss et al., 2005) pero más o menos similar a la observada en otros grupos como *Vibrio vulnificus* ($r/m = 26.7$ IC: 19.4–33.3) (Bisharat et al., 2007), *Salmonella entérica* ($r/m = 30.2$ IC: 21–36.5) (web.mpiib-berlin.mpg.de/mlst) y *Flavobacterium psychrophilum* ($r/m = 63.6$ IC: 32.8–82.8) (Nicolas et al., 2008). En estudios previos, *V. parahaemolyticus* se ha caracterizado por presentar una tasa de recombinación alta con un $r/m = 39.8$ con un intervalo de credibilidad de 27.4–48.2, aunque inferior a la detectada en las poblaciones de *V. parahaemolyticus* oceánicas procedentes de cepas ambientales (Gonzalez-Escalona et al., 2008)

La recombinación en la estructura poblacional de *V. parahaemolyticus* ha sido sostenida por los bajos valores del índice de asociación estandarizado (I^s_A) que mide el desequilibrio de ligamento entre los alelos del MLST. Se han observado valores significativos muy similares en ambas poblaciones (estuáricas: $I^s_A = 0.2874$ $P < 0.001$; oceánicas: $I^s_A = 0.2739$ $P < 0.001$) que al ser próximos a cero,

nos indica que los eventos de recombinación están presentes en estas poblaciones aunque haya una tendencia al desequilibrio de ligamento entre los alelos. Se ha observado en otros estudios que al tratar con cepas clínicas la estructura poblacional de *V. parahaemolyticus* tiende a ser clonal (Gonzalez-Escalona et al., 2008). Este fenómeno también ha sido publicado por Miragaia y col. para *Staphylococcus epidermidis* (Miragaia et al., 2007). Además, las estructuras radiantes obtenidas desde un mismo punto central en una filogenia estrellada visualizadas en el dendograma generado por el software "Split Tree" proponen una frecuente recombinación en la población de *V. parahaemolyticus* en ambos hábitats (Fig 24). También se han obtenido evidencias estadísticamente significativas para la recombinación en ambas poblaciones detectadas con el test de Phi (Huson and Bryant, 2006). Estos resultados aparentemente son contradictorios con otros reportados para otras bacterias como *V. cholerae* (Garg et al., 2003) y *S. epidermidis* (Miragaia et al., 2007) para los cuales se ha propuesto una estructura poblacional epidémica. Además, Gonzalez-Escalona y colaboradores han sugerido que las poblaciones de *V. parahaemolyticus* siguen este modelo epidémico de la expansión clonal de la bacteria, donde los complejos clonales más adaptados emergen de un fondo de bacterias altamente recombinantes (Feil, 2004). Estos clones luego diversifican predominantemente por recombinación más que por mutaciones puntuales. La paradoja entre clonalidad y alta diversidad debería ser resuelta con un estudio más complejo añadiendo un mayor número de cepas.

Una gran diferencia entre la bibliografía publicada de *V. parahaemolyticus* utilizando la técnica del MLST, es que este estudio es el primer trabajo con cepas ambientales realizado en Europa para conocer la estructura poblacional de esta bacteria. *V. parahaemolyticus* es genéticamente diverso, con una estructura poblacional "semiclonal" en poblaciones ambientales de *V. parahaemolyticus* *tdh+*/*trh-* en hábitats estuáricos y una gran heterogeneidad entre individuos *tdh-*/*trh+* sobretudo en poblaciones oceánicas y los eventos de recombinación frecuentes parecen jugar un papel importante en la diversificación clonal. El MLST es un análisis que proporciona un mecanismo de disponibilidad universal para el reconocimiento de las tendencias evolutivas y la aparición de complejos clonales de *V. parahaemolyticus*. La aplicación de intervenciones como el control de las aguas de lastre y la vigilancia sanitaria en cultivos marinos podría reducir las consecuencias en la salud pública si los nuevos complejos clonales de mayor virulencia se propagasen.

CONCLUSIONES

- La incidencia de *V. parahaemolyticus* detectada en este estudio proporciona una nueva visión de la composición y dinámica de las poblaciones de *V. parahaemolyticus* en zonas estuáricas de Galicia y demuestra que las poblaciones potencialmente patógenas *trh+* y *tdh+* forman parte de la flora en el medioambiente marino gallego.
- La presencia de idénticos grupos genéticos en distintas áreas y en diferentes periodos del año sugiere que algunas de estas poblaciones potencialmente patógenas podrían ser endémicas de estas zonas.
- Las poblaciones de *V. parahaemolyticus tdh+/trh-* fueron detectadas en las tres zonas estuáricas de A Coruña, Ferrol y Vigo y principalmente concentradas en puntos de muestreo que se corresponden al lugar de anclaje de barcos dedicados al transporte marítimo internacional. Esto podría indicar que las aguas de lastre de los barcos podrían ser uno de los principales vehículos en la introducción de poblaciones potencialmente patógenas de *V. parahaemolyticus* en Galicia procedentes de otras áreas del mundo.
- Cuatro cepas de *V. parahaemolyticus tdh+/trh+* detectadas en Ferrol representan la primera evidencia de cepas ambientales con estas características particulares en Europa.
- Una extraordinaria presencia de aislamientos de *V. parahaemolyticus trh+* en estas áreas estuáricas contrasta con la ausencia total de casos de infección asociados con estas cepas. Asimismo, los especímenes de *V. parahaemolyticus tdh+* presentaron perfiles no relacionados con el clon clínico dominante en España y con aislamientos del clon pandémico.
- La supervivencia de *V. parahemolyticus* en aguas oceánicas ha revelado que estos ecosistemas pueden ser un hábitat común para esta bacteria, incluyendo sus poblaciones patógenas.
- La distribución y fenología de zooplancton ha sido exclusivamente el factor dominante en la presencia de *V. parahaemolyticus* controlando su dinámica poblacional y estacional, debido a que el zooplancton le proporciona un ambiente de protección pudiendo sobrevivir bajo condiciones adversas en hábitats oceánicos.

- *V. parahaemolyticus* fue detectado en zonas de cultivo de moluscos de Galicia durante todo el estudio con máximos de abundancia en los meses de verano. Sin embargo la dinámica estacional de *V. cholerae* presentó un comportamiento diferente, mostrándose únicamente en el primer semestre del año. Esto contrasta con la ausencia de infecciones detectadas en Galicia debido a la baja incidencia de las poblaciones potencialmente patógenas de *V. parahaemolyticus* en zonas de cultivo de moluscos.
- La temperatura oceánica ha sido el factor dominante que gobierna la dinámica de *V. parahemolyticus* en la Ría de Arousa, sin embargo la presencia y abundancia de fitoplancton fueron las variables que han regido la estructura poblacional de *V. cholerae*.
- *V. parahaemolyticus* es genéticamente diverso, con una estructura poblacional “semiclinal” en poblaciones estuáricas de *V. parahaemolyticus* *tdh*⁺/*trh*⁻, aunque presenta una gran heterogeneidad entre los especímenes *tdh*⁻/*trh*⁺ de *V. parahaemolyticus* tanto de hábitats estuáricos como oceánicos.
- Los valores obtenidos del “Índice de Asociación Estandarizado” (IA^s) han sido similares tanto en poblaciones estuáricas como oceánicas indicándonos que los eventos de recombinación están presentes en estas poblaciones aunque haya una tendencia al desequilibrio de ligamento entre los alelos.
- Altos índices de recombinación homóloga han sido observados en poblaciones oceánicas de *V. parahaemolyticus*, proporcionando una mayor diversidad y variabilidad entre los individuos de *V. parahaemolyticus* *tdh*⁻/*trh*⁺ de estos ecosistemas.
- Las poblaciones de *V. parahaemolyticus* de zonas oceánicas han sido más recombinantes que las estuáricas debido a su asociación con el zooplancton, ya que la quitina del zooplancton parece ser uno de los factores responsables de estos eventos de recombinación favoreciendo la transferencia horizontal de genes entre las poblaciones oceánicas de *V. parahaemolyticus*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, M., and Moss, M.(1997).*Microbiología de los alimentos*: Acribia.
2. Agasan, A.(2002).*Vibrio parahaemolyticus*, Shellfish - USA (New York): Alert. *ProMED*.
3. Ahmed, S., Bardhan, P.K., Iqbal, A., Mazumder, R.N., Khan, A.I., Islam, M.S. et al.(2011).The 2008 Cholera Epidemic in Zimbabwe: Experience of the icddr, b Team in the Field. *Journal of health, population, and nutrition* 29: 541.
4. Akeda, Y., Kodama, T., Kashimoto, T., Cantarelli, V., Horiguchi, Y., and Nagayama, K., et al.(2002).Dominant-negative Rho,Rac, and Cds42 facilitate the invasion process of *Vibrio parahaemolyticus* into CaCO-2 cells. *Infection and Immunity* 70: 970-973.
5. Alam, M.J., Miyoshi, S.I., and Shinoda, S.(2003).Studies on pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* during a warm weather season in the Seto Inland Sea, Japan. *Environmental Microbiology* 5: 706-710.
6. Alsina, M., and Blanch, A.R.(1994).A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology* 76: 79-85.
7. Álvarez-Salgado, X., Gago, J., Míguez, B., Gilcoto, M., and Pérez, F.(2000). Surface waters of the NW Iberian margin: upwelling on the shelf versus outwelling of upwelled waters from the Rías Baixas. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 51: 821-837.
8. Amako, K., Shimodori, S., Imoto, T., Miake, S., and Umeda, A.(1987).Effects of chitin and its soluble derivatives on survival of *Vibrio cholerae* O1 at low temperature. *Appl Environ Microbiol* 53: 603-605.
9. Anonymous.(1999). *Vibrio parahaemolyticus*, Japan 1996–1998. *Infectious Agents Surveillance Report (IASR)* 20: 1-2.
10. Anonymous.(2001).Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on *Vibrio Vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. Geneva, Switzerland: European Commission.
11. Anonymous.(2005).Quantitative risk assessment on the public health impact of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters. *US Food and Drug Administration, Washington, DC*.
12. Ansaruzzaman, M., Lucas, M., Deen, J.L., Bhuiyan, N., Wang, X.Y., Safa, A. et al.(2005).Pandemic serovars (O3: K6 and O4: K68) of *Vibrio parahaemolyticus* associated with diarrhea in Mozambique: spread of the pandemic into the African continent. *Journal of clinical microbiology* 43: 2559-2562.

13. Ansede-Bermejo, J., Gavilán, R.G., Triñanes, J., Espejo, R.T., and Martinez-Urtaza, J.(2010).Origins and colonization history of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* in South America. *Molecular ecology* 19: 3924-3937.
14. Anuario-Pesca.(2007). Servizo de Producción Pesqueira da Dirección Xeral de Recursos Mariños. Consellería de Pesca.
15. Baffone, W., Tarsi, R., Pane, L., Campana, R., Repetto, B., Mariottini, G.L., and Pruzzo, C.(2006). Detection of free-living and plankton-bound vibrios in coastal waters of the Adriatic Sea (Italy) and study of their pathogenicity associated properties. *Environmental Microbiology* 8: 1299-1305.
16. Baker-Austin, C., Stockley, L., Rangdale, R., and Martinez-Urtaza, J.(2010). Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: a European perspective. *Environmental Microbiology Reports* 2: 7-18.
17. Barker, W.H.(1974). *Vibrio parahaemolyticus* outbreaks in the United States. *The Lancet* 303: 551-554.
18. Barrow, G.(1974). Microbiological and others hazards from seafoods with special reference to *V. parahaemolyticus*. *Postgraduate Medical Journal* 50: 612-619.
19. Bartlett, D.H., and Azam, F.(2005). Chitin, cholera, and competence. *Science* 310: 1775-1777.
20. Bartolomé, R., Ramirez, A., Molero, X., and Arcalis, L.(1989). Acute gastroenteritis due to *Vibrio parahaemolyticus*. Serotypes and presentation of 4 new cases. *Medicina Clinica (Barcelona)* 92: 38.
21. Bartual, S.G., Seifert, H., Hippler, C., Luzon, M.A.D., Wisplinghoff, H., and Rodríguez-Valera, F.(2005). Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of clinical microbiology* 43: 4382-4390.
22. Baudry, B., Fasano, A., Ketley, J., and Kaper, J.(1992). Cloning of a gene (zot) encoding a new toxin produced by *Vibrio cholerae*. *Infection and immunity* 60: 428-434.
23. Bauer, A., Ostensvik, O., Florvag, M., Ormen, O., and Rorvik, L.M.(2006). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, and *V. vulnificus* in Norwegian Blue Mussels (*Mytilus edulis*). *Applied Environmental Microbiology*, 72: 3058-3061.
24. Baumann, P., Furniss, A.L., and Lee, J.V.(1984).Genus I. *Vibrio*. *Bergey's manual of systematic bacteriology* 1: 518-538.

25. Bej, A.K., Patterson, D.P., Brasher, C.W., Vickery, M.C.L., Jones, D.D., and Kaysner, C.A. (1999). Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *Journal of Microbiological Methods* 36: 215-225.
26. Berche, P., Poyart, C., Abachin, E., Lelievre, H., Vandepitte, J., Dodin, A., and Fournier, J.M. (1994). The Novel Epidemic Strain 0139 Is Closely Related To The Pandemic Strain 01 Of *Vibrio Cholerae* [X]. *Journal of Infectious Diseases* 170: 701.
27. Bik, E., Bunschoten, A., Gouw, R., and Mooi, F.(1995). Genesis of the novel epidemic *Vibrio cholerae* O139 strain: evidence for horizontal transfer of genes involved in polysaccharide synthesis. *The EMBO journal* 14: 209.
28. Binsztein, N., Costagliola, M.C., Pichel, M., Jurquiza, V., Ramírez, F.C., Akselman, R. et al. (2004). Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina. *Applied and environmental microbiology* 70: 7481-7486.
29. Bisharat, N., Cohen, D.I., Maiden, M.C., Crook, D.W., Peto, T., and Harding, R.M.(2007). The evolution of genetic structure in the marine pathogen, *Vibrio vulnificus*. *Infection, Genetics and Evolution* 7: 685-693.
30. Bisharat, N., Cohen, D.I., Harding, R.M., Falush, D., Crook, D.W., Peto, T., and Maiden, M.C.(2005). Hybrid *Vibrio vulnificus*. *Emerg Infect Dis* 11: 30-35.
31. Blackstone, G.M., Nordstrom, J.L., Vickery, M.C.L., Bowen, M.D., Meyer, R.F., and DePaola, A.(2003). Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 53: 149-155.
32. Blake, P.A. (1994) Historical perspective on pandemic cholerae. In *Vibrio cholerae* and Cholera: Molecular and to Global Perspective. Wachsmuth, I.K., Blake and Olsvik. O. (eds) (ed). Washington, DC,American Society for Microbiology, pp. 293-295.
33. Blake, P.A., Allegra, D.T., Snyder, J.D., Barrett, T.J., McFarland, L., Caraway, C.T. et al.(1980). Cholera—a possible endemic focus in the United States. *New England journal of medicine* 302: 305-309.
34. Blanco-Abad, V., Ansede-Bermejo, J., Rodriguez-Castro, A., and Martinez-Urtaza, J.(2009). Evaluation of different procedures for the optimized detection of *Vibrio parahaemolyticus* in mussels and environmental samples. *International Journal of Food Microbiology* 129: 229-236.

35. Borroto, R.J.(1997). La ecología de *Vibrio cholerae* serogroupo 01 en ambientes acuáticos. *Pan American Journal of Public Health* 1: 3-8.
36. Borroto, R.J.(1998). Supervivencia de *Vibrio cholerae* O1 en agua dulce superficial y cólera endémico: una hipótesis geoecológica. *Revista Panamericana de Salud Pública* 4.
37. Boudouresque, C.F., and Verlaque, M.(2002). Biological pollution in the Mediterranean Sea: invasive versus introduced macrophytes. *Marine Pollution Bulletin* 44: 32-38.
38. Butler, S.M., and Camilli, A.(2005). Going against the grain: chemotaxis and infection in *Vibrio cholerae*. *Nature Reviews Microbiology* 3: 611-620.
39. Cabanillas-Beltrán, H., Llausás-Magaña, E., Romero, R., Espinoza, A., García-Gasca, A., Nishibuchi, M. et al.(2006). Outbreak of gastroenteritis caused by the pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 in Mexico. *FEMS microbiology letters* 265: 76-80.
40. Cabrera-García, M.E., Vázquez-Salinas, C., and Quiñones-Ramírez, E.I.(2004). Serologic and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from seawater and fish products of the Gulf of Mexico. *Applied and environmental microbiology* 70: 6401-6406.
41. Caburlotto, G., Ghidini, V., Gennari, M., Tafi, M., and Lleo, M.(2008). Isolation of a *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strain from a marine water sample obtained in the northern Adriatic. *Euro surveillance* 13: 105-106.
42. Cary, J.W., and Bhatnagar, D.(2000). *Microbial foodborne diseases: Mechanisms of pathogenesis and toxin synthesis*: CRC.
43. Centers for Disease Control and Prevention, C.(1998). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with eating raw oysters–Pacific Northwest, 1997. *Morbidity and Mortality Weekly Reports* 47: 457–462.
44. Centers for Disease Control and Prevention, C.(1999). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infection associated with eating raw oysters and clams harvested from Long Island Sound - Connecticut, New Jersey and New York, 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 48: 48-51.
45. Centers for Disease Control and Prevention, C. (2002). Standardized molecular subtyping of foodborne bacterial pathogens by pulsed-field gel electrophoresis. *Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.*
46. Centers for Disease Control and Prevention, C.(2010). Update: outbreak of cholera ---Haiti, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 59: 1586-1590.

47. Colwell, R., Kaper, J., and Joseph, S. (1977). *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and other vibrios: occurrence and distribution in Chesapeake Bay. *Science* 198: 394-396.
48. Colwell, R.R.(1996). Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science* 274: 2025-2031.
49. Colwell, R.R., and Huq, A.(1994). Environmental Reservoir of *Vibrio cholerae* The Causative Agent of Cholera. *Annals of the New York Academy of Sciences* 740: 44-54.
50. Colwell, R.R., Spira, W.M., Barua, D., and Greenough III, W. (1992). The ecology of *Vibrio cholerae*. In *Cholera Plenum Medical Book Co.* In D. Barua and W. B. Greenough, I.e. (ed). New York, pp. 107-127.
51. Colwell, R.R., Seidler, R.J., Kaper, J., Joseph, S., Garges, S., Lockman, H. et al.(1981). Occurrence of *Vibrio cholerae* serotype O1 in Maryland and Louisiana estuaries. *Applied and environmental microbiology* 41: 555-558.
52. Colwell, R.R.J.G. (2000) Semantics and strategies. En non-culturable microorganisms in the environment. In *American Society for Microbiology Press.* (eds), C.R.R.J.G. (ed). Washington D. C, pp. 1-6.
53. Comision del Codex Alimentarius ALINORM 10/33/13. 2010. Programa Conjunto FAO/ OMS sobre Normas Alimentarias. Trigésimo tercer período de sesiones Ginebra, Suiza, del 5 al 9 de julio de 2010. http://www.ftp://ftp.fao.org/codex/Alinorm10/al33_13s.pdf.
54. Constantin de Magny, G., Murtugudde, R., Sapiiano, M.R.P., Nizam, A., Brown, C.W., Busalacchi, A.J. et al.(2008). Environmental signatures associated with cholera epidemics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 17676.
55. Costagliola M., M.A., Guerrero R., Ma D., Odizzio M., Abelenda A., De Kereki C.(2000). Estudio de la presencia de *Vibrio cholerae* en la Zona Común de Pesca Argentina-Uruguay. Periodo 1992-1996. *Frente Marítimo* 18: 53-58.
56. Crespo, B., Figueiras, F., Porras, P., and Teixeira, I.(2006). Downwelling and dominance of autochthonous dinoflagellates in the NW Iberian margin: the example of the Ría de Vigo. *Harmful Algae* 5: 770-781.
57. Chao, G., Jiao, X., Zhou, X., Yang, Z., Pan, Z., Huang, J. et al.(2009). Systematic Functional Pandemic Strain-Specific Genes, Three Genomic Islands, Two T3SSs in Foodborne, and Clinical *Vibrio parahaemolyticus* Isolates in China. *Foodborne Pathogens and Disease* 6: 689-698.

58. Charlesworth, J., and Eyre-Walker, A.(2006). The rate of adaptive evolution in enteric bacteria. *Molecular biology and evolution* 23: 1348-1356.
59. Chavez, F., Strutton, P., Friederich, G., Feely, R., Feldman, G., Foley, D., and McPhaden, M.(1999). Biological and chemical response of the equatorial Pacific Ocean to the 1997-98 El Niño. *Science* 286: 2126-2131.
60. Chimetto, L.A., Brocchi, M., Thompson, C.C., Martins, R.C.R., Ramos, H.R., and Thompson, F.L.(2008). Vibrios dominate as culturable nitrogen-fixing bacteria of the Brazilian coral *Mussismilia hispida*. *Systematic and Applied Microbiology* 31: 312-319.
61. Chowdhury, N.R., Stine, O.C., Morris, J.G., and Nair, G.(2004). Assessment of evolution of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* by multilocus sequence typing. *Journal of clinical microbiology* 42: 1280-1282.
62. Chowdhury, N.R., Chakraborty, S., Ramamurthy, T., Nishibuchi, M., Yamasaki, S., Takeda, Y., and Nair, G.B.(2000b). Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. *Emerging Infectious Diseases* 6: 631-636.
63. Chowdhury, N.R., Chakraborty, S., Eampokalap, B., Chaicumpa, W., Chongsang-Nguan, M., Moolasart, P. et al.(2000). Clonal dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* displaying similar DNA fingerprint but belonging to two different serovars (O3:K6 and O4:K68) in Thailand and India. *Epidemiology and Infection* 125: 17-25.
64. Dadisman Jr, T.A., Nelson, R., Molenda, J.R., and Garber, H.J.(1972). *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis in Maryland I. Clinical and epidemiologic aspects. *American journal of epidemiology* 96: 414-426.
65. Dalsgaard, A., Forslund, A., Mortensen, H.F., and Shimada, T.(1998). Ribotypes of clinical *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 strains in relation to O-serotypes. *Epidemiology and Infection* 121: 535-545.
66. Daniels, N.A., MacKinnon, L., Bishop, R., Altekruse, S., Ray, B., Hammond, R.M. et al.(2000). *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973–1998. *Journal of Infectious Diseases* 181: 1661-1666.
67. Daniels, N.A., Evans, M.C., and Griffin, P.M. (2000a). Noncholera Vibrios. In *Emerging Infections* In W. M. Scheld, W.A.C., and J. M. Hughes (eds.) (ed). Washington, DC, USA: American Society of Microbiology, pp. 237-247.
68. Daniels, N.A., Ray, B., Easton, A., Marano, N., Kahn, E., McShan, A.L., 2nd et al.(2000b). Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters: A prevention quandary. *JAMA* 284: 1541-1545.

69. Dawson, M.P., Humphrey, B.A., and Marshall, K.C.(1981). Adhesion: A tactic in the survival strategy of a marine vibrio during starvation. *Current Microbiology* 6: 195-199.
70. de Magny, G.C., Mozumder, P.K., Grim, C.J., Hasan, N.A., Naser, M.N., Alam, M. et al.(2011). Role of Zooplankton Diversity in *Vibrio cholerae* Population Dynamics and in the Incidence of Cholera in the Bangladesh Sundarbans. *Applied and environmental microbiology* 77: 6125-6132.
71. Deepanjali, A., Kumar, H.S., Karunasagar, I., and Karunasagar, I.(2006).Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India. *Applied and environmental microbiology* 71: 3575–3580.
72. DePaola, A., and Hwang, G.C. (1995). Effect of dilution, incubation time, and temperature of enrichment on cultural and PCR detection of *Vibrio cholerae* obtained from the oyster *Crassostrea virginica*. *Molecular and cellular probes* 9: 75-81.
73. DePaola, A., Kaysner, C.A., Bowers, J., and Cook, D.W.(2000). Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). *Applied and environmental microbiology* 66: 4649-4654.
74. DePaola, A., Hopkins, L.H., Peeler, J.T., Wentz, B., and McPhearson, R.M.(1990). Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. coastal waters and oysters. *Applied and environmental microbiology* 56: 2299-2302.
75. DePaola, A., Nordstrom, J.L., Bowers, J.C., Wells, J.G., and Cook, D.W.(2003). Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. *Applied and environmental microbiology* 69: 1521-1526.
76. DePaola, A., Ulaszek, J., Kaysner, C.A., Tenge, B.J., Nordstrom, J.L., Wells, J. et al.(2003b). Molecular, serological, and virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia. *Applied and environmental microbiology* 69: 3999-4005.
77. DePaola, A., Capers, G.M., Motes, M.L., Olsvik, O., Fields, P.I., Wells, J. et al.(1992). Isolation of Latin American epidemic strain of *Vibrio cholerae* O1 from US Gulf Coast. *Lancet* 339: 624.
78. DePaola, A., Jones, J.L., Woods, J., Burkhardt III, W., Calci, K.R., Krantz, J.A. et al.(2010). Bacterial and viral pathogens in live oysters: 2007 United States market survey. *Applied and environmental microbiology* 76: 2754-2768.

79. Di Pinto, A., Ciccarese, G., De Corato, R., Novello, L., and Terio, V.(2008). Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in southern Italian shellfish. *Food Control* 19: 1037-1041.
80. Didelot, X., and Falush, D.(2007). Inference of bacterial microevolution using multilocus sequence data. *Genetics* 175: 1251-1266.
81. Dingle, K., Colles, F., Wareing, D., Ure, R., Fox, A., Bolton, F. et al.(2001). Multilocus Sequence Typing System for *Campylobacter jejuni*. *Journal of clinical microbiology* 39: 14-23.
82. Doblin, M.A., Popels, L.C., Coyne, K.J., Hutchins, D.A., Cary, S.C., and Dobbs, F.C.(2004). Transport of the harmful bloom alga *Aureococcus anophagefferens* by ocean going ships and coastal boats. *Applied and environmental microbiology* 70: 6495-6500.
83. Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., and Hacker, J.(2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Reviews Microbiology* 2: 414-424.
84. Doyle, M.P.(1990). Pathogenic *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *Lancet* 336: 1111-1115.
85. Dumontet, S., Krovacek, K., Baloda, S.B., Grottoli, R., Pasquale, V., and Vanucci, S.(1996). Ecological relationship between *Aeromonas* and *Vibrio* spp. and planktonic copepods in the coastal marine environment in southern Italy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 19: 245-254.
86. Ellingsen, A., Jørgensen, H., Wagley, S., Monshaugen, M., and Rørvik, L.(2008). Genetic diversity among Norwegian *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Applied Microbiology* 105: 2195-2202.
87. Elliot, E.L., Kaysner, C.A., and Tamplin, M.(1992). *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and other *Vibrio* spp. *US Food and Drug Administration Bacteriological*: 111-140.
88. Enright, M.C., and Spratt, B.G.(1998). A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* 144: 3049-3060.
89. Enright, M.C., Day, N.P.J., Davies, C.E., Peacock, S.J., and Spratt, B.G.(2000). Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology* 38: 1008-1015.
90. Epstein, P.R.(1993). Algal blooms in the spread and persistence of cholera. *Biosystems* 31: 209-221.

91. European_Commission.(2001). Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General, Brussels, Belgium*.
92. Falush, D., Kraft, C., Taylor, N.S., Correa, P., Fox, J.G., Achtman, M., and Suerbaum, S.(2001). Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 15056.
93. Farmer III J J, J.M., Birkhead K. En Murray P, Baron E J, Jørgensen J H, Pfaller M A, Tenover F C, Tenover H H.(2003). *Manual of Clinical Microbiology* 8th Ed. ASM Press, Washington D.C., USA. 706-718.
94. Faruque, S.M., Albert, M.J., and Mekalanos, J.J.(1998). Epidemiology, Genetics, and Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiology and molecular biology reviews* 62: 1301-1314.
95. Faruque, S.M., Saha, M.N., Sack, D.A., Sack, R.B., Takeda, Y., and Nair, G.B.(2000). The O139 serogroup of *Vibrio cholerae* comprises diverse clones of epidemic and nonepidemic strains derived from multiple *V. cholerae* O1 or non-O1 progenitors. *Journal of Infectious Diseases* 182: 1161-1168.
96. Fasano, A., Baudry, B., Pumphlin, D.W., Wasserman, S.S., Tall, B.D., Ketley, J.M., and Kaper, J.(1991). *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 5242.
97. FDA (2005) Quantitative risk assessment on the public health impact of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters. In *FDA, Washington, DC*.
98. Fearnhead, P., Smith, N.G.C., Barrigas, M., Fox, A., and French, N.(2005). Analysis of Recombination in *Campylobacter jejuni* from MLST Population Data. *Journal of molecular evolution* 61: 333-340.
99. Feil, E., Zhou, J., Smith, J.M., and Spratt, B.G.(1996). A comparison of the nucleotide sequences of the *adk* and *recA* genes of pathogenic and commensal *Neisseria* species: Evidence for extensive interspecies recombination within *adk*. *Journal of molecular evolution* 43: 631-640.
100. Feil, E.J.(2004). Small change: keeping pace with microevolution. *Nature Reviews Microbiology* 2: 483-495.
101. Feil, E.J., Holmes, E.C., Bessen, D.E., Chan, M.S., Day, N.P.J., Enright, M.C. et al.(2001). Recombination within natural populations of pathogenic

- bacteria: short-term empirical estimates and long-term phylogenetic consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 182.
102. Fishbein, M., Wentz, B., Landry, W., and MacEachern, B. (1974). *Vibrio parahaemolyticus* isolates in the US: 1969–1972. In.
 103. Franco, A.A., Fix, A.D., Prada, A., Paredes, E., Palomino, J.C., Johnson, J.A. et al.(1997). Cholera in Lima, Peru, correlates with prior isolation of *Vibrio cholerae* from the environment. *American journal of epidemiology* 146: 1067-1075.
 104. Fraser, C., Hanage, W.P., and Spratt, B.G.(2007).Recombination and the nature of bacterial speciation. *Science* 315: 476-480.
 105. Fujino, K.(1966). *Vibrio parahaemolyticus*. *Nihon Ishikai Zasshi* 56: 24-27.
 106. Fujino, K.(1974). Discovery of *Vibrio parahaemolyticus*. *Nihon Saikingaku Zasshi* 21: 373-388.
 107. Fujino, T., Okuno, D., Nakada, A., Aoyama, A., Fukay, K., Mukay, T., et al.(1953).On the bacteriological examination of shirasu food poisoning. *Medical journal of Osaka University* 4: 299-304.
 108. Garg, P., Aydanian, A., Smith, D., Morris Jr, J.G., Nair, G.B., and Stine, O.C.(2003). Molecular epidemiology of O139 *Vibrio cholerae*: mutation, lateral gene transfer, and founder flush. *Emerging Infectious Diseases* 9: 810.
 109. Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T.G. (2004). Taxonomic Outline of the Prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 112-3.
 110. Genin, A., Jaffe, J.S., Reef, R., Richter, C., and Franks, P.J.S.(2005). Swimming against the flow: a mechanism of zooplankton aggregation. *Science* 308: 860-862.
 111. Gomez-Couso, H., Freire-Santos, F., Martinez-Urtaza, J., Garcia-Martin, O., and Ares-Mazas, M.(2003). Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: the need for new quality control standards. *International Journal of Food Microbiology* 87: 97-105.
 112. Gonzalez-Escalona, N., Martinez-Urtaza, J., Romero, J., Espejo, R.T., Jaykus, L.A., and DePaola, A.(2008). Determination of molecular phylogenetics of *Vibrio parahaemolyticus* strains by multilocus sequence typing. *Journal of Bacteriology* 190: 2831-2840.
 113. Gonzalez-Escalona, N., Cachicas, V., Acevedo, C., Rioseco, M.L., Vergara, J.A., Cabello, F. et al.(2005). *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerging Infectious Diseases* 11: 129-131.
 114. González, H., Pagés, F., Sobarzo, M., and Escribano, R.(2002). Effects of the 1997-98 El Niño on the oceanographic conditions and zooplankton

- community structure in the coastal upwelling system off northern Chile. *Investigaciones marinas* 30: 112-114.
115. Gopal, S., Otta, S.K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M., and Karunasagar, I.(2005). The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology* 102: 151-159.
 116. Goss, E.M., Kreitman, M., and Bergelson, J.(2005). Genetic diversity, recombination and cryptic clades in *Pseudomonas viridiflava* infecting natural populations of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 169: 21-35.
 117. Guthmann, J.(1995). Epidemic cholera in Latin America: spread and routes of transmission. *The Journal of tropical medicine and hygiene* 98: 419.
 118. Guttman, D.S., and Dykhuizen, D.E.(1994). Clonal divergence in *Escherichia coli* as a result of recombination, not mutation. *Science* 266: 1380-1383.
 119. Halpern, M., Senderovich, Y., and Izhaki, I.(2008). Waterfowl—The Missing Link in Epidemic and Pandemic Cholera Dissemination? *PLoS pathogens* 4: e1000173.
 120. Hanage, W.P., Fraser, C., and Spratt, B.G.(2006). The impact of homologous recombination on the generation of diversity in bacteria. *Journal of theoretical biology* 239: 210-219.
 121. Hara-Kudo, Y., Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Hasegawa, J., and Kumagai, S.(2001). Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *Applied and environmental microbiology* 67: 5819-5823.
 122. Hara-Kudo, Y., Sugiyama, K., Nishibuchi, M., Chowdhury, A., Yatsuyanagi, J., Ohtomo, Y. et al.(2003). Prevalence of pandemic thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 in seafood and the coastal environment in Japan. *Applied and environmental microbiology* 69: 3883-3891.
 123. Heitmann G, I., Jofré M, L., Hormázabal, J.C., Olea N, A., Vallebuona S, C., and Valdés H, C.(2005). Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista chilena de infectología* 22: 131-140.
 124. Herrera, F., Santos, J., Otero, A., and García-López, M.L.(2006). Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. *Journal of Applied Microbiology* 100: 527-536.
 125. Herrington, D.A., Hall, R.H., Losonsky, G., Mekalanos, J.J., Taylor, R., and Levine, M.M.(1988). Toxin, toxin-coregulated pili, and the *toxR* regulon

- are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. *The Journal of experimental medicine* 168: 1487.
126. Hervio-Heath, D., Colwell, R., Derrien, A., Robert-Pillot, A., Fournier, J., and Pommeypuy, M.(2002). Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. *Journal of Applied Microbiology* 92: 1123-1135.
 127. Ho, H., and Amin, H. (2000). E-medicine: *Vibrio* Infections.
 128. Hoffmann, M., Fischer, M., Ottesen, A., McCarthy, P.J., Lopez, J.V., Brown, E.W., and Monday, S.R.(2010). Population dynamics of *Vibrio* spp. associated with marine sponge microcosms. *ISME Journal* 4: 1608-1612.
 129. Homan, W.L., Tribe, D., Poznanski, S., Li, M., Hogg, G., Spalburg, E. et al.(2002). Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *Journal of clinical microbiology* 40: 1963-1971.
 130. Honda, T., and Iida, T.(1993). The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins. *Reviews in Medical Microbiology* 4: 106.
 131. Honda, T., Ni, Y., and Miwatani, T.(1988). Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infection and immunity* 56: 961-965.
 132. Hood, M.A., and Ness, G.E.(1982). Survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in estuarine waters and sediments. *Applied and environmental microbiology* 43: 578-584.
 133. Hooper, W., Barrow, G., and McNab, D.(1974). *Vibrio parahaemolyticus* food-poisoning in Britain. *The Lancet* 303: 1100-1102.
 134. Huang, K.C., and Hsu, R.W.(2005). *Vibrio fluvialis* hemorrhagic cellulitis and cerebritis. *Clinical Infectious Diseases* 40: e75-77.
 135. Hugh, R., and Sakazaki, R.(1975). International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Vibrios. *International Journal of Systematic Bacteriology* 25: 389-391.
 136. Huq, A., Small, E.B., West, P.A., Huq, M.I., Rahman, R., and Colwell, R.R.(1983). Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Appl Environ Microbiol* 45: 275-283.
 137. Huq, A., Sack, R.B., Nizam, A., Longini, I.M., Nair, G.B., Ali, A. et al.(2005). Critical factors influencing the occurrence of *Vibrio cholerae* in the environment of Bangladesh. *Applied and environmental microbiology* 71: 4645-4654.

138. Hurley, C., Quirke, A.M., Reen, F.J., and Boyd, E.F.(2006). Four genomic islands that mark post-1995 pandemic *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *BMC genomics* 7: 104.
139. Huson, D.H., and Bryant, D.(2006).Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular biology and evolution* 23: 254-267.
140. Iida, T., Park, K.S., Suthienkul, O., Kozawa, J., Yamaichi, Y., Yamamoto, K., and Honda, T.(1998). Close proximity of the *tdh*, *trh* and *ure* genes on the chromosome of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology* 144 (Pt 9): 2517-2523.
141. Ingresoll, E. (1881) The history and present condition of the fishery industries: the oyster industry. In. Washington, DC: Department of the Interior.
142. International Commission on Microbiological Specifications for Foods, I. (1996) Microorganismos de los alimentos. Características de los patógenos microbianos. In: Acribia.
143. International Disease Surveillance Center, I. (1999). *Vibrio parahaemolyticus*, Japan 1996-1998. *Infectious Agents Surveillance Report (IASR)* 20: 1-2.
144. ISO 8914 (1990). Microbiology -- General guidance for the detection of *Vibrio parahaemolyticus*.
145. Janda, J.M., Powers, C., Bryant, R.G., and Abbott, S.L.(1988). Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. *Clinical Microbiology Reviews* 1: 245-267.
146. Jesudason, M., Balaji, V., Mukundan, U., and Thomson, C.(2000). Ecological study of *Vibrio cholerae* in Vellore. *Epidemiology and Infection* 124: 201-206.
147. Jiang, S.C., and Paul, J.H.(1998). Gene transfer by transduction in the marine environment. *Applied and environmental microbiology* 64: 2780-2787.
148. Johnson, C., Flowers, A., Young, V., Gonzalez-Escalona, N., DePaola, A., Noriega, N., and Grimes, D.(2009). Genetic relatedness among *tdh*⁺ and *trh*⁺ *Vibrio parahaemolyticus* cultured from Gulf of Mexico oysters (*Crassostrea virginica*) and surrounding water and sediment. *Microbial ecology* 57: 437-443.
149. Johnson, C., Flowers, A., Noriega III, N., Zimmerman, A., Bowers, J., DePaola, A., and Grimes, D.(2010). Relationships between environmental factors and pathogenic Vibrios in the Northern Gulf of Mexico. *Applied and environmental microbiology* 76: 7076-7084.

150. Jolley, K., Wilson, D., Kriz, P., McVean, G., and Maiden, M.(2005). The influence of mutation, recombination, population history, and selection on patterns of genetic diversity in *Neisseria meningitidis*. *Molecular biology and evolution* 22: 562-569.
151. Joseph, S.W., Colwell, R.R., and Kaper, J.B.(1982). *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic Vibrios. *Critical Reviews in Microbiology* 10: 77-124.
152. Julie, D., Solen, L., Antoine, V., Jaufrey, C., Annick, D., and Dominique, H.H.(2010). Ecology of pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* on the French Atlantic coast. Effects of temperature, salinity, turbidity and chlorophyll a. *Environmental Microbiology* 12: 929-937.
153. Kaneko, T., and Colwell, R.R.(1973). Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Journal of Bacteriology* 113: 24-32.
154. Kaneko, T., and Colwell, R.(1975). Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Applied microbiology* 30: 251-257.
155. Kaneko, T., and Colwell, R.R.(1978). Annual cycle of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Microb Ecol* 4: 135–155.
156. Kaper, J., Lockman, H., Colwell, R., and Joseph, S.(1979). Ecology, serology, and enterotoxin production of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. *Applied and environmental microbiology* 37: 91-103.
157. Kaper, J.B., Morris, J.G., Jr., and Levine, M.M.(1995). Cholera. *Clinical Microbiology Reviews* 8: 48-86.
158. Karaolis, D.K.R., Johnson, J.A., Bailey, C.C., Boedeker, E.C., Kaper, J.B., and Reeves, P.R.(1998). A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 3134.
159. Kaspar, C.W., and Tamplin, M.L.(1993). Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Applied and environmental microbiology* 59: 2425-2429.
160. Kaysner C. A. and DePaola, A.J. (2001) "Vibrio". In *Bacteriological Analytical Manual*, pp. 405-428.
161. Kelly, M.T., and Stroh, E.M.D.(1988).Temporal relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in patients and the environment. *Journal of Clinical Microbiology* 26: 1754–1756.
162. Keymer, D.P., and Boehm, A.B.(2011). Recombination shapes the structure of an environmental *Vibrio cholerae* population. *Applied and environmental microbiology* 77: 537-544.

163. Khwaif, J., Hayyawi, A., and Yousif, T.(2010). Cholera outbreak in Baghdad in 2007: an epidemiological study. *East Mediterranean Health J* 16: 584-589.
164. Kim, Y.B., Okuda, J., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S., and M., N.(1999). Identification of *Vibrio parahaemolyticus* at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1173-1177.
165. Kingman, J.F.C.(1982). The coalescent. *Stochastic processes and their applications* 13: 235-248.
166. Kowalczykowski, S.C., Dixon, D.A., Eggleston, A.K., Lauder, S.D., and Rehrauer, W.M.(1994). Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiological reviews* 58: 401.
167. Lederberg, J., and Tatum, E.L.(1946). Gene recombination in *Escherichia coli*. *Nature* 158: 558.
168. Lee, R., and Younger, A.(2002). Developing microbiological risk assessment for shellfish purification. *International biodeterioration & biodegradation* 50: 177-183.
169. Lee, R., and Morgan, O.(2003). Environmental factors influencing the microbiological contamination of commercially harvested shellfish. *Water science and technology*: 65-70.
170. Lemoine, T., Germanetto, P., and Giraud, P.(1999). Toxi-infection alimentaire collective à *Vibrio parahaemolyticus*. *Bull épidémiol Hebd* 10: 37-38.
171. Letunic, I., and Bork, P.P.(2007). Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* 23: 127-128.
172. Leyton, Y., and Riquelme, C.(2008). Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Revista de biología marina y oceanografía* 43: 441-456.
173. Lin, F., Morris Jr, J., Kaper, J., Gross, T., Michalski, J., Morrison, C. et al.(1986). Persistence of cholera in the United States: isolation of *Vibrio cholerae* O1 from a patient with diarrhea in Maryland. *Journal of clinical microbiology* 23: 624-626.
174. Lipp, E.K., Huq, A., and Colwell, R.R.(2002). Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 757-770.
175. Lowry, P.W., Pavia, A.T., McFarland, L.M., Peltier, B.H., Barrett, T.J., Bradford, H.B. et al.(1989). Cholera in Louisiana: widening spectrum of seafood vehicles. *Archives of internal medicine* 149: 2079.

176. Lozano-León, A., Torres, J., Osorio, C.R., and Martínez-Urtaza, J.(2003). Identification of *tdh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. *FEMS microbiology letters* 226: 281-284.
177. Lukinmaa, S., Mattila, K., Lehtinen, V., Hakkinen, M., Koskela, M., and Siitonen, A.(2006). Territorial waters of the Baltic Sea as a source of infections caused by *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139: report of 3 hospitalized cases. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 54: 1-6.
178. Mahasneh, A.M., and Al-Sayed, H.A.(1997). Seasonal incidence of some heterotrophic aerobic bacteria in Bahrain pelagic and nearshore waters and oysters. *International journal of environmental studies* 51: 301-312.
179. Maiden, M.C.J.(2006). Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* 60: 561-588.
180. Maiden, M.C.J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R. et al.(1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 3140.
181. Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K. et al.(2003). Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *The Lancet* 361: 743-749.
182. Martinelli Filho, J.E.(2011). A associação entre o zooplâncton e *Vibrio cholerae* O1 e O139 no complexo estuarino de Santos-Bertioga e Plataforma adjacente.
183. Martinez-Urtaza, J., Bowers, J.C., Trinanes, J., and DePaola, A.(2010). Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses. *Food Research International* 43: 1780-1790.
184. Martinez-Urtaza, J., Lozano-Leon, A., Varela-Pet, J., Trinanes, J., Pazos, Y., and Garcia-Martin, O.(2008b). Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the rias of Galicia, Spain. *Applied and environmental microbiology* 74: 265-274.
185. Martinez-Urtaza, J., Lozano-Leon, A., DePaola, A., Ishibashi, M., Shimada, K., Nishibuchi, M., and Liebana, E.(2004). Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 4672-4678.

186. Martinez-Urtaza, J., Huapaya, B., Gavilan, R.G., Blanco-Abad, V., Ansedo-Bermejo, J., Cadarso-Suarez, C. et al.(2008). Emergence of Asiatic *Vibrio* diseases in South America in phase with El Nino. *Epidemiology* 19: 829-837.
187. Martinez-Urtaza, J., Simental, L., Velasco, D., DePaola, A., Ishibashi, M., Nakaguchi, Y. et al.(2005). Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. *Emerging Infectious Diseases* 11: 1319-1320.
188. Martínez, R., and Villalobos, L.(2005). *Escherichia coli* enteropatógena en moluscos crudos y cocidos. *Rev Cient* 15: 163-167.
189. Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Rammamurthy, T. et al.(2000). Pandemic spread of an O3: K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses. *Journal of clinical microbiology* 38: 578-585.
190. Maugeri, T.L., Caccamo, D., and Gugliandolo, C.(2000). Potentially pathogenic vibrios in brackish waters and mussels. *Journal of Applied Microbiology* 89: 261-266.
191. Maynard- Smith, J., Smith, N.H., O'Rourke, M., and. Spratt B. G. (1993). How clonal are bacteria?. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 4384-4388.
192. McCarthy, S.A., and Khambaty, F.M.(1994). International dissemination of epidemic *Vibrio cholerae* by cargo ship ballast and other nonpotable waters. *Applied and environmental microbiology* 60: 2597-2601.
193. McLaughlin, J.(1995). *Vibrio. Manual of clinical microbiology* 6.
194. McLaughlin, J.B., DePaola, A., Bopp, C.A., Martinek, K.A., Napolilli, N.P., Allison, C.G. et al.(2005). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. *New England Journal of Medicine* 353: 1463-1470.
195. Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C. et al.(1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5: 607-625.
196. Meador, C.E., Parsons, M.M., Bopp, C.A., Gerner-Smidt, P., Painter, J.A., and Vora, G.J.(2007). Virulence gene-and pandemic group-specific marker profiling of clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Journal of clinical microbiology* 45: 1133-1139.
197. Meibom, K.L., Blokesch, M., Dolganov, N.A., Wu, C.Y., and Schoolnik, G.K.(2005). Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science* 310: 1824-1827.

198. Mekalanos, J.J., Rubin, E.J., and Waldor, M.K.(1997). Cholera: molecular basis for emergence and pathogenesis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 18: 241-248.
199. Mekalanos, J.J., Swartz, D.J., Pearson, G., Harford, N., Groyne, F., and de Wilde, M.(1983). Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. *Nature* 306: 551.
200. Milkman, R., and Bridges, M.M.K.(1990). Molecular evolution of the *Escherichia coli* chromosome. III. Clonal frames. *Genetics* 126: 505-517.
201. Miller, C.J., Drasar, B.S., and Feachem, R.G.(1984).Response of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 to physico-chemical stresses in aquatic environments. *Epidemiology and Infection* 93: 475-495.
202. Minami, A., Hashimoto, S., Abe, H., Arita, M., Taniguchi, T., Honda, T. et al.(1991). Cholera enterotoxin production in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated from the environment and from humans in Japan. *Applied and environmental microbiology* 57: 2152-2157.
203. Miragaia, M., Thomas, J., Couto, I., Enright, M., and De Lencastre, H.(2007). Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology* 189: 2540-2552.
204. Mishra, A., Taneja, N., and Sharma, M.(2012). Environmental and epidemiological surveillance of *Vibrio cholerae* in a cholera endemic region in India with freshwater environs. *Journal of Applied Microbiology*.
205. Miwat, N., Kashiwagi, M., Kawamori, F., Masuda, T., Sano, Y., Hiroi, M., and Kurashige, H.(2006). Levels of *Vibrio parahaemolyticus* and thermostable direct hemolysin gene-positive organisms in retail seafood determined by the most probable number-polymerase chain reaction (MPN-PCR) method. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 47: 41-45.
206. Mohanty, S., Kapil, A., and Das, B.K.(2004). Seasonality and antimicrobial resistance pattern of *Vibrio cholerae* in a tertiary care hospital of North India. *Tropical doctor* 34: 249.
207. Molero, X., Barolomé, R.M., Vinuesa, T., Guarner, L., Accarino, A., Casellas, F., and Garcia, R.(1989). Acute gastroenteritis due to *Vibrio parahaemolyticus* in Spain. Presentation of 8 cases. *Medicina Clinica (Barcelona)* 92: 1-4.
208. Moreno, C., Romero, J., and Espejo, R.T.(2002). Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio*. *Microbiology* 148: 1233-1239.

209. Morris, J.G., and Acheson, D.(2003). Cholera and other types of vibriosis: a story of human pandemics and oysters on the half shell. *Clinical Infectious Diseases* 37: 272.
210. Morris, J.G., Jr., and Black, R.E.(1985). Cholera and other vibrioses in the United States. *New England Journal of Medicine* 312: 343-350.
211. Morris Jr, J.G.(1990). Non-O group 1 *Vibrio cholerae*: a look at the epidemiology of an occasional pathogen. *Epidemiologic reviews* 12: 179.
212. Morris Jr, J.G., Wilson, R., Davis, B.R., Wachsmuth, I.K., Riddle, C.F., Wathen, H.G. et al.(1981). Non-O group 1 *Vibrio cholerae* gastroenteritis in the United States. *Annals of internal medicine* 94: 656-658.
213. Motes Jr, M., Zywno, S., DePaola, A., Becker, R., and Presnell, M.(1983). Isolation of *Vibrio cholerae* serotype Ogawa from a Florida estuary. *Applied and environmental microbiology* 45: 321-322.
214. Motes, M.L., DePaola, A., Cook, D.W., Veazey, J.E., Hunsucker, J.C., Garthright, W.E. et al.(1998). Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*). *Applied and environmental microbiology* 64: 1459-1465.
215. Mulnick, J.(2002). *Vibrio parahaemolyticus* summer '02. *Personal communication*.
216. Nair, G.B., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S.K., Dutta, B., Takeda, Y., and Sack, D.A.(2007). Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clinical Microbiology Reviews* 20: 39-48.
217. Nandi, B., Nandy, R.K., Mukhopadhyay, S., Nair, G.B., Shimada, T., and Ghose, A.C.(2000). Rapid Method for Species-Specific Identification of *Vibrio cholerae* Using Primers Targeted to the Gene of Outer Membrane Protein *ompW*. *Journal of clinical microbiology* 38: 4145-4151.
218. New Jersey Department of Environmental Protection. (2002). Portions of Delaware Bay closed for shellfish harvest. New Jersey Department of Environmental Protection News Release.
219. Nicolas, P., Mondot, S., Achaz, G., Bouchenot, C., Bernardet, J.F., and Duchaud, E.(2008). Population structure of the fish-pathogenic bacterium *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied and environmental microbiology* 74: 3702-3709.
220. Niimi, A.J.(2004). Role of container vessels in the introduction of exotic species. *Marine Pollution Bulletin* 49: 778-782.

221. Nishibuchi, M., and Kaper, J.B.(1995). Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infection and Immunity* 63: 2093-2099.
222. Nishibuchi, M., Fasano, A., Russell, R., and Kaper, J.(1992). Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding thermostable direct hemolysin. *Infection and immunity* 60: 3539-3545.
223. Nordstrom, J.L., Vickery, M.C.L., Blackstone, G.M., Murray, S.L., and DePaola, A.(2007). Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. *Applied and environmental microbiology* 73: 5840-5847.
224. Nowlan, L., and Kwan, I.(2001).Cruise Control - Regulating Cruise Ships Pollution on the Pacific COSAT of Canada. West Coast Environmental Law.
225. Oakley, B.B., Carbonero, F., van der Gast, C.J., Hawkins, R.J., and Purdy, K.J.(2010). Evolutionary divergence and biogeography of sympatric niche-differentiated bacterial populations. *The ISME Journal* 4: 488-497.
226. Oberbeckmann, S., Wichels, A., Wiltshire, K.H., and Gerdt, G.(2011). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* in the German Bight over a seasonal cycle. *Antonie van Leeuwenhoek*: 1-17.
227. Okada, N., Iida, T., Park, K.S., Goto, N., Yasunaga, T., Hiyoshi, H. et al.(2009).Identification and characterization of a novel type III secretion system in *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* strain TH3996 reveal genetic lineage and diversity of pathogenic machinery beyond the species level. *Infection and immunity* 77: 904-913.
228. Okuda, J., Ishibashi, M., Abbott, S.L., Janda, J.M., and Nishibuchi, M.(1997). Analysis of the thermostable direct hemolysin (tdh) gene and the tdh-related hemolysin (*trh*) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 1965-1971.
229. Okuda, J., Ishibashi, M., Hayakawa, E., Nishino, T., Takeda, Y., Mukhopadhyay, A.K. et al.(1997b). Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 3150-3155.

230. Oliver, J., and Kaper, J. (1997) *Vibrio* species. In Food microbiology: fundamentals and frontiers. MP Doyle, L.B., TJ Montville, (ed). Washington, DC, USA: American Society of Microbiology, pp. 228-264.
231. Oliver, J.D., and Kaper, J. (2007) *Vibrio* species. In Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 3rd edn. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., and Montville, T.J. (ed). Washington, DC, USA: American Society of Microbiology, pp. 343-379.
232. Olson, D., Hitchcock, G., Mariano, A., Ashjian, C., Peng, G., Nero, R., and Podesta, G.(1994). Life on the edge: marine life and fronts. *Oceanography* 7: 52-60.
233. Onifade, T.J., Hutchinson, R., Van Zile, K., Bodager, D., Baker, R., and Blackmore, C.(2011). Toxin producing *Vibrio cholerae* O75 outbreak, United States, March to April 2011. *Eurosurveillance* 16: 19870.
234. OPS.(1991). Epidemia de Cólera en el Perú y Pautas para su Control. *Bol Of Sanit Panam* 110: 277-297.
235. Organización Mundial de la Salud, O.(1974). Higiene del pescado y de los mariscos. Serie de Informes Técnicos. N° 150.
236. Ottaviani, D., Leoni, F., Rocchegiani, E., Santarelli, S., Canonico, C., Masini, L. et al.(2008). First clinical report of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 infection in Italy. *Journal of clinical microbiology* 46: 2144-2145.
237. Ottaviani, D., Leoni, F., Rocchegiani, E., Santarelli, S., Masini, L., Di Trani, V. et al.(2009). Prevalence and virulence properties of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* strains from seafood and clinical samples collected in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 132: 47-53.
238. Pan American Health Organization (PAHO) (2008).Number of cholera cases in the Americas (1990- 2008).
239. Panicker, G., Call, D.R., Krug, M.J., and Bej, A.K.(2004).Detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays. *Applied and environmental microbiology* 70: 7436-7444.
240. Pardío Sedas, V.T.(2007). Influence of environmental factors on the presence of *Vibrio cholerae* in the marine environment: a climate link. *The Journal of Infection in Developing Countries* 1: 224-241.
241. Paris-Mancilla, E.P.(2005). Intoxicación por *Vibrio parahaemolyticus*. *Cuadernos Médico Sociales (Chile)* 45: 43-47.

242. Park, K.S., Ono, T., Rokuda, M., Jang, M.H., Iida, T., and Honda, T.(2004b). Cytotoxicity and enterotoxicity of the thermostable direct hemolysin-deletion mutants of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology and immunology* 48: 313.
243. Park, K.S., Ono, T., Rokuda, M., Jang, M.H., Okada, K., Iida, T., and Honda, T.(2004). Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and immunity* 72: 6659-6665.
244. Parvathi, A., Kumar, H.S., Bhanumathi, A., Ishibashi, M., Nishibuchi, M., and Karunasagar, I.(2006). Molecular characterization of thermostable direct haemolysin-related haemolysin *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* from oysters in Mangalore, India. *Environ Microbiol* 8: 997-1004.
245. Parveen S., Hettiarachchi, K.A., Bowers, J.C., Jones, J.L., Tamplin, M.L., McKay, R. et al.(2008). Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters. *Int J Food Microbiol* 128: 354-361.
246. Pasquier, J.(1818). Essai Medicales sur les huitres, etc. Collections des theses (soutenues) a la Faculte de Medicina de Paris, Tome Huitieme 7: 49.
247. Pérez-Losada, M., Browne, E.B., Madsen, A., Wirth, T., Viscidi, R.P., and Crandall, K.A.(2006). Population genetics of microbial pathogens estimated from multilocus sequence typing (MLST) data. *Infection, Genetics and Evolution* 6: 97-112.
248. Perez, J.L., Cabré, M., Riera, L., Priu, R., and Berrocal, C.(1987). Gastroenteritis por *V. parahaemolyticus* asociada a consumo de ostra. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 5: 160-163.
249. Peterson, K., Zuppardo, A., and Sussman, M.(2002). *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. *Molecular medical microbiology: Volumes 1-3*: 1291-1309.
250. Phillips, A., DePaola, A., Bowers, J., LDNAer, S., and Grimes, D.(2007). An evaluation of the use of remotely sensed parameters for prediction of incidence and risk associated with *Vibrio parahaemolyticus* in Gulf Coast oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Food Protection* 70: 879-884.
251. Picaut, J., Ioualalen, M., Menkès, C., Delcroix, T., and McPhaden, M.(1996). Mechanism of the zonal displacements of the Pacific warm pool: Implications for ENSO. *Science* 274: 1486.
252. Popovic, T., Fields, P.I., Olsvik, O., Wells, J.G., Evins, G.M., Cameron, D.N. et al.(1995). Molecular subtyping of toxigenic *Vibrio cholerae* O139 causing epidemic cholera in India and Bangladesh, 1992–1993. *Journal of Infectious Diseases* 171: 122.

253. Posada, D.(2002) .Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: empirical data. *Molecular biology and evolution* 19: 708-717.
254. Potasman, I., Paz, A., and Odeh, M.(2002). Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clinical Infectious Diseases* 35: 921-928.
255. Potempa, A.(2004). *Vibrio parahaemolyticus*, oysters - USA (Alaska): bacterium sickens raw oyster eaters. *Anchorage Daily News* 3.
256. Preheim, S.P., Boucher, Y., Wildschutte, H., David, L.A., Veneziano, D., Alm, E.J., and Polz, M.F.(2011). Metapopulation structure of Vibrionaceae among coastal marine invertebrates. *Environmental Microbiology* 13: 265-275.
257. Pruzzo, C., Vezzulli, L., and Colwell, R.R.(2008). Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin. *Environmental Microbiology* 10: 1400-1410.
258. Quilici, M.L., Robert-Pillot, A., Picart, J., and Fournier, J.M.(2005). Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 spread, France. *Emerging Infectious Diseases* 11: 1148-1149.
259. Ramamurthy, T., Garg, S., Sharma, R., Bhattacharya, S.K., Nair, G.B., Shimada, T. et al.(1993). Emergence of novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India. *Lancet* 341: 703.
260. Razouls, C., De Bovée, F., Kouwenberg, J., and Desreumaux, N.(2005). Diversity and geographic distribution of marine planktonic copepods. Available from WWW:< [http://copepodes obs-banyuls fr/en](http://copepodes.obs-banyuls.fr/en)>[cited 2008-08-10].
261. Ripabelli, G., Sammarco, M.L., Grasso, G.M., Fanelli, I., Caprioli, A., and Luzzi, I.(1999). Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy. *International Journal of Food Microbiology* 49: 43-48.
262. Rippey, S.R.(1994). Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clinical Microbiology Reviews* 7: 419-425.
263. Robert-Pillot, A., Guénolé, A., Lesne, J., Delesmont, R., Fournier, J.M., and Quilici, M.L.(2004). Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. *International Journal of Food Microbiology* 91: 319-325.
264. Roberts, N., Siebeling, R., Kaper, J., and Bradford, H.(1982). Vibrios in the Louisiana gulf coast environment. *Microbial ecology* 8: 299-312.

265. Robertson, W., and Tobin, R.S.(1983). The relationship between three potential pathogens and pollution indicator organisms in Nova Scotian coastal waters. *Canadian journal of microbiology* 29: 1261-1269.
266. Rodó, X., Pascual, M., Fuchs, G., and Faruque, A.(2002). ENSO and cholera: A nonstationary link related to climate change? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 12901.
267. Romalde, J., Area, E., Sanchez, G., Ribao, C., Torrado, I., Abad, X. et al.(2002). Prevalence of enterovirus and hepatitis A virus in bivalve molluscs from Galicia (NW Spain): inadequacy of the EU standards of microbiological quality. *International Journal of Food Microbiology* 74: 119-130.
268. Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., and Rozas, R.(2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
269. Rozemeijer, W., Korswagen, L., AE, V., and AE, B.(2009). *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 infection in an immunocompromised patient returning from Spain, July 2009. *Euro Surveill* 14: 19298.
270. S-Granjel Santander, L., and Granjel, L.S.(1980). El cólera y la España ochocentista.
271. Sakazaki, R., Iwanami, S., and Tamura, K.(1968). Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacterium, *Vibrio parahaemolyticus*. II. Serological characteristics. *Japanese journal of medical science & biology* 21: 313.
272. Salcedo, C., Arreaza, L., Alcalá, B., De La Fuente, L., and Vazquez, J.(2003). Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones. *Journal of clinical microbiology* 41: 757-762.
273. Sample, T., and Swanson, C. (1997). Chronology of *Vibrio parahaemolyticus* illness outbreak, West Coast of North America - 1997. In "Minutes to *Vibrio parahaemolyticus* Workshop",. Seattle, Washington.
274. Scharer, K., Savioz, S., Cernela, N., Saegesser, G., and Stephan, R.(2011). Occurrence of *Vibrio* spp. in Fish and Shellfish Collected from the Swiss Market. *Journal of Food Protection* 74: 1345-1347.
275. Schets, F.M., van den Berg, H.H.J.L., Rutjes, S.A., de Roda, H., and Maria, A.(2010). Pathogenic *Vibrio* species in Dutch shellfish destined for direct human consumption. *Journal of Food Protection* 73: 734-738.
276. Schreiber, W., and Mathys, F.(1987). Infection. In Hoffmann F, ed. Basilea:La Roche.

277. Seas, C., Miranda, J., Gil, A., Leon-Barua, R., Patz, J., Huq, A. et al.(2000). New insights on the emergence of cholera in Latin America during 1991: the Peruvian experience. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 62: 513-517.
278. Seed, R.(1992). Systematics, evolution and distribution of mussels belonging to the genus *Mytilus*: an overview. *American Malacological Bulletin* 9: 123-137.
279. Shandera, W.X., Hafkin, B., Martin, D.L., Taylor, J.P., Maserang, D.L., Wells, J.G. et al.(1983). Persistence of cholera in the United States. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 32: 812.
280. Shirai, H., Ito, H., Hirayama, T., Nakamoto, Y., Nakabayashi, N., Kumagai, K. et al.(1990). Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. *Infection and Immunity* 58: 3568-3573.
281. Simidu, U., Ashino, K., and Kaneko, E.(1971). Bacterial flora of phyto and zooplankton in the inshore water of Japan. *Canadian Journal of Microbiology* 17: 1157-1160.
282. Simpson, J.M., Santo Domingo, J.W., and Reasoner, D.J.(2002). Microbial source tracking: state of the science. *Environmental science & technology* 36: 5279-5288.
283. Singleton, F., Attwell, R., Jangi, S., and Colwell, R.(1982). Effects of temperature and salinity on *Vibrio cholerae* growth. *Applied and environmental microbiology* 44: 1047-1058.
284. Smith, C.(2003). Oyster-associated *Vibrio parahaemolyticus*. *Personal communication*.
285. Smith, J.M., Smith, N.H., O'Rourke, M., and Spratt, B.G.(1993). How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 4384.
286. Smith, N.H., Holmes, E.C., Donovan, G.M., Carpenter, G.A., and Spratt, B.G.(1999). Networks and groups within the genus *Neisseria*: analysis of *argF*, *recA*, *rho*, and 16S rRNA sequences from human *Neisseria* species. *Molecular biology and evolution* 16: 773-783.
287. Speelman, E.C., Checkley, W., Gilman, R.H., Patz, J., Calderon, M., and Manga, S.(2000). Cholera incidence and El Nino-related higher ambient temperature. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 283: 3072-3074.

288. Steinberg, E.B., Greene, K.D., Bopp, C.A., Cameron, D.N., Wells, J.G., and Mintz, E.D.(2001). Cholera in the United States, 1995–2000: trends at the end of the twentieth century. *Journal of Infectious Diseases* 184: 799.
289. Stumpf, M.P.H., and McVean, G.A.T.(2003). Estimating recombination rates from population-genetic data. *Nature Reviews Genetics* 4: 959-968.
290. Summer, J., DePaola, A., Osaka, K., Karaunasager, I., Walderhaug, M., and Bowers, J.(2001). Hazard identification, exposure assesment and hazard characterization of *Vibrio spp* in seafood. *Joint FAO/WHO activities on risk Assesment of Microbiological Hazard in foods*: 1-105
291. Swerdlow, D., and Ries, A.(1993). *Vibrio cholerae* non-O1- the eighth pandemic? . *Lancet* 342: 382.
292. Tada, J., Nishimura, N., Ozaki, H., Takano, J., and Takeda.Y.(1992). Detection of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 6: 477-487.
293. Tamplin, M.L.(2001). Coastal vibrios: identifying relationships between environmental condition and human disease. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 7: 1437-1445.
294. Tamplin, M.L., Gauzens, A.L., Huq, A., Sack, D.A., and Colwell, R.R.(1990). Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. *Applied and environmental microbiology* 56: 1977-1980.
295. Tang, H.J., Chang, M.C., Ko, W.C., Huang, K.Y., Lee, C.L., and Chuang, Y.C.(2002). In vitro and in vivo activities of newer fluoroquinolones against *Vibrio vulnificus*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3580-3584.
296. Tantillo, G.M., Fontanarosa, M., Di Pinto, A., and Musti, M.(2004). Updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections. *Letters in Applied Microbiology* 39: 117-126.
297. Terzi, G., Buyuktanir, O., and Yurdusev, N.(2009). Detection of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates in fish and mussels from Middle Black Sea Coast of Turkey. *Letters in Applied Microbiology* 49: 757-763.
298. Therien, N.(1999). Washington State vibriosis cases. *Symposium on Molluscan Shellfish Sanitation, Tacoma, WA*.
299. Thomas, K.U., Joseph, N., Raveendran, O., and Nair, S.(2006). Salinity-induced survival strategy of *Vibrio cholerae* associated with copepods in Cochin backwaters. *Marine Pollution Bulletin* 52: 1425-1430.

300. Thompson, F.L., Iida, T., and Swings, J.(2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiology and molecular biology reviews* 68: 403-431.
301. Thompson, J.R., Randa, M.A., Marcelino, L.A., Tomita-Mitchell, A., Lim, E., and Polz, M.F.(2004b). Diversity and dynamics of a North Atlantic coastal *Vibrio* community. *Applied and environmental microbiology* 70: 4103-4110.
302. Thongchankaew, U., Mittraparp-arthorn, P., Sukhumungoon, P., Tansila, N., Nuidate, T., Nishibuchi, M., and Vuddhakul, V.(2011). Occurrence of potentially pathogenic vibrios and related environmental factors in Songkhla Lake, Thailand. *Canadian journal of microbiology* 57: 867-873.
303. Trucksis, M., Galen, J.E., Michalski, J., Fasano, A., and Kaper, J.B.(1993). Accessory cholera enterotoxin (*Ace*), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 5267.
304. Twedt, R.M., Madden, J.M., Hunt, J.M., Francis, D.W., Peeler, J.T., Duran, A.P. et al.(1981). Characterization of *Vibrio cholerae* Isolated from Oysters. *Environmental Microbiology* 41: 1475-1478.
305. Ulloa, O., Escribano, R., Hormazabal, S., Quinones, R.A., González, R.R., and Ramos, M.(2001). Evolution and biological effects of the 1997-98 El Niño in the upwelling ecosystem off northern Chile. *Geophysical Research Letters* 28: 1591-1594.
306. Vezzulli, L., Previati, M., Pruzzo, C., Marchese, A., Bourne, D.G., and Cerrano, C.(2010). *Vibrio* infections triggering mass mortality events in a warming Mediterranean Sea. *Environmental Microbiology* 12: 2007-2019.
307. Villalpando-Guzman, S., Eusebio-Hernandez, M.G., and Aviles-Ruiz, D.(2000). Detection of *Vibrio cholerae* O: 1 in oysters by the visual colorimetric immunoassay and the culture technique. *Revista Latinoamericana de Microbiologia-Mexico-* 42: 63-68.
308. Vos, M., and Didelot, X.(2008). A comparison of homologous recombination rates in bacteria and archaea. *The ISME Journal* 3: 199-208.
309. Wagley, S., Koofhethile, K., Wing, J.B., and Rangdale, R.(2008). Comparison of *V. parahaemolyticus* isolated from seafoods and cases of gastrointestinal disease in the UK. *International journal of environmental health research* 18: 283-293.
310. Waldor, M.K., and Mekalanos, J.J.(1996). Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 272: 1910-1914.
311. Waldor, M.K., Rubin, E.J., Pearson, G.D.N., Kimsey, H., and Mekalanos, J.J.(1997). Regulation, replication, and integration functions of the *Vibrio*

- cholerae* CTX ϕ are encoded by region RS2. *Molecular Microbiology* 24: 917-926.
312. Watnick, P.I., and Kolter, R.(1999). Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Molecular Microbiology* 34: 586-595.
313. West, P.(1989). The human pathogenic vibrios—A public health update with environmental perspectives. *Epidemiology and Infection* 103: 1-34.
314. West, S.C.(2003). Molecular views of recombination proteins and their control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4: 435-445.
315. Wittman, R., and Flick, G.(1995). Microbial contamination of shellfish: prevalence, risk to human health, and control strategies. *Annual review of public health* 16: 123-140.
316. Wong, H.C., Liu, S.H., Wang, T.K., Lee, C.L., Chiou, C.S., Liu, D.P. et al.(2000). Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. *Applied and environmental microbiology* 66: 3981-3986.
317. World Health Organization (1980).Cholera surveillance. *Weekly Epidemiol Rec* 14: 101-102.
318. World Health Organization (2010).Cholera 2009. *Weekly epidemiological record* 85: 293-308.
319. World Health Organization, W.(2002).Cholera, 2001. *Weekly epidemiological record* 77: 257-265.
320. Yamaichi, Y., Iida, T., Park, K-S., Yamamoto, K. y T. Honda.(1999).Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*, presence of two chromosomes in *Vibrio* species. . *Mol Microbiol* 31: 1513-1521.
321. Yan, Y., Cui, Y., Han, H., Xiao, X., Wong, H., Tan, Y. et al.(2011).Extended MLST-based population genetics and phylogeny of *Vibrio parahaemolyticus* with high levels of recombination. *International Journal of Food Microbiology* 145: 106-112.
322. Yang, Z., Jiao, X., Zhou, X., Cao, G., Fang, W., and Gu, R.(2008).Isolation and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from fresh, low-temperature preserved, dried, and salted seafood products in two coastal areas of eastern China. *International Journal of Food Microbiology* 125: 279-285.

ANEXOS

ANEXO 1: Preparación de medios de cultivo

Medio 1. Agua Peptonada Alcalina (APW)

Peptona	20 g
NaCl	10 g
Agua destilada	1 litro

- Agitar
- Ajustar a pH 8.5
- Autoclave 15 minutos a 121 °C

Medio 2. Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose Agar (TCBS)

TCBS	88 g
Agua destilada	1 litro

- Agitar con calor.
- Llevar a ebullición (100 °C) repetidas veces, agitando continuamente para que no se queme el agar en el fondo del matraz.
- Temperar en un baño de 48 °C.
- Dispensar en placas estériles.

Medio 3. CHROMagar

CHROMagar	74.7 g
Agua destilada	1 litro

- Agitar con calor.
- Llevar a ebullición (100°C) repetidas veces, agitando continuamente para que no se queme el agar en el fondo del matraz.
- Temperar en un baño de 48 °C.
- Dispensar en placas estériles.

Medio 4. Trypticase Soy Agar (TSA al 2% NaCl)

TSA	40 g
NaCl	15 g
Agua destilada	1 litro

- Llevar a ebullición (100 °C) agitando continuamente para que no se queme el agar en el fondo del matraz.
- Autoclave 15 minutos a 121 °C
- Temperar en un baño de 48 °C
- Dispensar en placas estériles.

Medio 5. TE Buffer (10mM Tris : 1mM EDTA, pH8.0)

Tris (Tris-HCl, 1M)	10 ml
EDTA (0'5 M)	2 ml
Agua estéril	1 litro

Medio 6. Chelex – 100 5%:

Quelex_100	15 g
Agua estéril	285 ml

Medio 7. Saline Luria-Bertani Broth (LB 2% NaCl)

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	20 g
Agua destilada	1 litro

- Agitar hasta disolución
- Ajustar a pH 7
- Autoclave 15 minutos a 121 °C

Medio 8. Gel de agarosa

Agarosa.....	1,6g
TBE 1X	100 ml

- Llevar a ebullición hasta 3 veces (microondas)
- Temperar en un baño a 57 °C
- Verter en el molde y dejar enfriar

Medio 9. Bromuro de etidio

Bromuro de etidio	0'84 µl
Agua destilada	1000 ml

Medio 10. Gel de agarosa de PFGE

1% Seakem Gold.....	1.5 g
TBE 0'5X (especial PFGE).....	150ml

Medio 11. Tampón TBE 0.5X

TBE (PFGE)	50 ml
Agua destilada	950 ml

Medio 12. Agua Peptonada (BPW)

Peptona	20 g
Agua destilada	1000 ml

- Agitar
- Ajustar a pH 7 ± 0.2
- Autoclave 15 minutos a 121 °C

Medio 13. Nutrient Agar (NA)

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 litro

- Llevar a ebullición (100 °C) agitando continuamente para que no se queme el agar en el fondo del matraz.
- Autoclave 15 minutos a 121 °C
- Temperar en un baño de 48 °C
- Dispensar en placas estériles

Medio 14. Luria-Bertani Broth (LB)

Tryptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua destilada	1 litro

- Agitar hasta disolución
- Ajustar a pH 7
- Autoclave 15 minutos a 121 °C

PUBLICACIONES

PUBLICACIONES

Relación de artículos y comunicaciones a congresos originados por los trabajos de investigación que derivan de la elaboración de la presente tesis doctoral.

Artículos publicados:

- **Rodríguez-Castro, A.**, Ansede-Bermejo, J. Blanco-Abad, V., Varela-Pet, J., Garcia-Martin, O. and Martinez-Urtaza, J. (2010). Prevalence and genetic diversity of pathogenic populations of *Vibrio parahaemolyticus* in coastal waters of Galicia, Spain. *Environmental Microbiology Reports* 2, 58–66.
- Martinez-Urtaza, J., Blanco-Abad, V., **Rodríguez-Castro, A.**, Ansede-Bermejo, J., Miranda, A., and Rodríguez-Alvarez., M. X. (2012). Ecological determinants of the occurrence and dynamics of *Vibrio parahaemolyticus* in offshore areas. *The ISME Journal*, 1-13.

Otros artículos:

- Blanco-Abad, V., Ansede-Bermejo, J., **Rodríguez-Castro, A.**, and Martinez-Urtaza, J. (2009). Evaluation of different procedures for the optimized detection of *Vibrio parahaemolyticus* in mussels and environmental samples. *International Journal of Food Microbiology* **129**: 229-236.

Ponencias en Congresos Científicos:

- **Rodríguez-Castro A.**, Ansede-Bermejo J, Blanco-Abad V and Martínez-Urtaza J. 2007. Isolation of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from Environmental Sources in Three International Seaports in Galicia, Spain. 107th General Meeting of American Society for Microbiology. Toronto, Canadá.
- **Rodríguez-Castro A.**, Ansede-Bermejo J, Blanco-Abad V and Martinez-Urtaza J. 2008. Seasonal Variation and Diversity of *Vibrio cholerae* and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Populations in Oysters in the Ría de Arousa, Spain. 108th General Meeting of American Society for Microbiology. Boston, USA.
- Martinez-Urtaza J, Blanco Abad V, **Rodríguez-Castro A.**, Ansede-Bermejo J, Cadarso-Suarez C and Rodríguez-Alvarez MJ. 2008. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in the water column of two coastal environments of Galicia (Spain). ISME12, Cairns, Australia.

V. cholerae y *V. parahaemolyticus* son las principales especies patógenas del género *Vibrio* responsables de un importante número de infecciones transmitidas por alimentos de origen marino. Estudios realizados en Galicia han revelado una importante presencia y persistencia de *V. parahaemolyticus* con características patógenas en el medio marino. Sin embargo, la información disponible actualmente para entender la biología y la epidemiología de este microorganismo es limitada. En consecuencia, este estudio fue enfocado a identificar los reservorios naturales de las poblaciones patógenas de *Vibrio* en el medio ambiente marino de Galicia con el fin de determinar su distribución y dinámica poblacional tanto en ambientes oceánicos como estuáricos, identificando los factores ambientales que condicionan la abundancia de las distintas subpoblaciones en los diferentes hábitats. Los resultados de este trabajo han revelado una extraordinaria presencia de las poblaciones patógenas de *V. parahaemolyticus* en zonas estuáricas, mostrando que constituyen un componente natural de las poblaciones ambientales de este organismo en hábitats costeros. La dinámica estacional de *V. parahaemolyticus* en zonas de cultivo de molusco ha sido diferente a la de *V. cholerae*, destacando una mayor incidencia de *V. parahaemolyticus* en los meses de verano, mientras que *V. cholerae* sólo fue detectado en el primer semestre del año. Todas las muestras positivas de ostras para *V. cholerae* fueron no O1/no O139 y *ctxA* negativo. La presencia y abundancia de *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* estuvo principalmente modulada por la temperatura del agua de mar y por la presencia de fitoplancton, respectivamente. Una alta incidencia de *V. parahaemolyticus* fue detectada en áreas oceánicas, lo que sugiere que estos ecosistemas son un hábitat común para *V. parahaemolyticus*. Por otra parte, se observó que la estructura poblacional de *V. parahaemolyticus* es muy diversa en los diferentes hábitats, detectándose altos índices de recombinación homóloga y una gran diversidad especialmente entre los individuos de las poblaciones oceánicas. Sin embargo, las poblaciones de *V. parahaemolyticus* en zonas estuáricas presentaron una estructura “semiclinal” con índices de recombinación más bajos, sobretodo en especímenes de *V. parahaemolyticus* *tdh*⁺.

V. cholerae and *V. parahaemolyticus* are the major pathogenic species among the genus *Vibrio* and are involved in a significant number of seafood-borne infections. Studies carried out in Galicia have revealed a significant presence and persistence of *V. parahaemolyticus* with pathogenic traits among the environmental populations present in the sea. However, the scarce scientific knowledge available for a comprehensive understanding of the biology and epidemiology of this organism is limited. Therefore, the aims allowed to identify the natural reservoirs of the pathogenic populations of *V. parahaemolyticus* in the marine environment of Galicia. This information determined the distribution and population dynamics of pathogenic *V. parahaemolyticus* both in the offshore waters and in estuarine environments and identifies the environmental factors determining the abundance of the different sub-populations in diverse habitats. The results of this thesis have revealed an extraordinary presence of pathogenic populations of *V. parahaemolyticus* in estuarine areas, which are constitutive components of the environmental populations in coastal habitats. The seasonal dynamics of *V. parahaemolyticus* in shellfish growing areas has been different to the *V. cholerae*, highlighting a highest incidence of *V. parahaemolyticus* in the summer months. *V. cholerae* was only detected in the first half of the year. All positive oyster samples for *V. cholerae* were identified belonging to the non-O1/non139 group and *ctxA* negative. The presence and abundance of *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae* were mainly modulated by seawater temperature and presence of phytoplankton, respectively. A high incidence of *V. parahaemolyticus* was detected in offshore areas, which suggests that these ecosystems may be a common habitat for *V. parahaemolyticus*. Moreover, the population structure of *V. parahaemolyticus* was diversity in the different habitats, with high levels of homologous recombination and a great diversity among individuals in offshore areas. However, populations of *V. parahaemolyticus* in estuarine areas showed a structure “semiclinal” with lower homologous recombination rates, especially in specimens of *V. parahaemolyticus* *tdh*⁺.